

①

乳 癌 に お け る 癌 細 胞 核 D N A 量 と 臨 床 病 理 学
的 所 見 お よ び 予 後 と の 関 連 性 に つ い て

本 文 4 3 枚

附 図 1 0 枚

附 表 9 枚

写 真 4 枚

長 谷 川 善 枝

弘 前 大 学 医 学 部 外 科 学 第 一 講 座

(指 導 鯉 江 久 昭 教 授)

I . 緒 言

本邦における乳癌患者は年々増加してきている。診断技術の向上や集団検診の普及等により治癒可能な乳癌症例も増加してきているが、初治療時にまだ比較的早期の症例でも再発例が散見され、また、進行乳癌においては種々の集学的治療にも拘らず生命予後はそれほど改善されていないのが現状である。このことから、癌細胞自体のもつ生物学的悪性度の検討が種々の方面からなされており、特に癌細胞核DNA量は悪性腫瘍の生物学的悪性度を反映し、予後を規定する一因子としての重要性が報告されている^{1), 2)}。

一方、*in vivo*における悪性腫瘍の進展は宿主要因も絡んで複雑な経過をたどると考えられる。臨床病理学、腫瘍免疫学その他の分野では様々な面からこの宿主要因についての検討が行なわれている^{3) - 5)}。

この腫瘍の生物学的悪性度と腫瘍に対する宿主の応答能との関連性を知ることによって、

患者の予後を推測することができれば、術式の選択や術後の補助療法を能率的に施行でき、治療成績の向上が期待できるのではないかと考えた。腫瘍側の因子として癌細胞の核DNA量を flow cytometry を用いて測定するとともに乳癌細胞に特有な estrogen receptor (ER) の有無について検討した。一方宿主側の因子を知る一指標として切除標本の癌病巣部の lymphoid cell infiltration (LI)、所属リンパ節 sinus histiocytosis (SH)、および germinal center hyperplasia (GCH) の3項目について病理組織学的に検討し、これらの諸因子と患者の予後との関連性をみた。

II . 対象と方法

1 . 研究対象

1979年4月から1989年12月まで当科において乳房切断術を施行した原発性乳癌症例のうち、摘出腫瘍及び廓清リンパ節の保存が良好であった110例、同時期に弘前市立病院、五

所川原市立西北中央病院で乳房切断術を施行し病理標本の保存が良好であった症例をあわせ185例を対象とした(表1)。年齢は21歳から81歳までで、平均年齢は 48.0 ± 12.0 歳であった。全症例のうち閉経前は112例、閉経後は73例であり、乳癌取扱い規約⁶⁾による臨床病期分類ではI期43例、II期78例、III a期35例、III b期16例、IV期13例であった。原発巣の組織型は充実腺管癌82例、乳頭腺管癌45例、硬癌39例、その他の組織型19例であった。その他の組織型の内訳は非浸潤性乳管癌3例、粘液癌7例、髄様癌3例、浸潤性小葉癌1例、腺様嚢胞癌1例、扁平上皮癌3例、印環細胞癌1例であった。これらの症例について癌細胞核DNA量を測定し、また病理組織学的検索を行なった。また、リンパ節転移陽性症例のうちの35症例においてリンパ節転移巣についても同様に細胞核DNA量を測定し、原発巣の核DNA量との比較検討を行なった。

2. 研究方法

1) 癌細胞核DNA量の測定

(1) 単離裸核浮遊細胞液の作成

切除標本のパラフィン包埋ブロックより厚さ40 μ mの切片を作成し、Hedleyら⁷⁾⁻⁹⁾の方法を用いて癌細胞の分離、裸核化を行なった。即ち、キシレンにて10分間、2回の脱パラフィンを行なった後、段階的濃度(100%, 95%, 90%, 70%, 50%)のエタノールで各々10分間処理する再水和を行なった。材料を眼科用鉗で細切した後、蒸留水にて2回洗浄、引き続き0.5%ペプシン溶液(pH1.5)を加え37℃, 90分間incubateし、細胞の裸核化を行なった。これを50 μ mナイロンメッシュにて濾過、リン酸緩衝液にて2回洗浄し、単離細胞浮遊液を得た。なお、単離細胞浮遊液の一部をスライドグラス上に塗抹し、Giemsa染色を行ない鏡検し浮遊細胞の裸核化の状態を観察し確認した(写真1)。

(2) 核DNA染色

ペプシン処理にて得られた単離細胞浮遊液

を 0.1% RNase にて 37℃ , 20 分 間 処 理 し た 後 、
50 ng / dl の propidium iodide (PI) にて 遮 光 下
に 20 分 間 染 色 し た 。

(3) 核 DNA 量 の 測 定

核 DNA 量 の 測 定 に は Becton-Dickinson 社 の
fluorescence activated cell sorter (FACS) IV を 用 い た 。 細 胞 を 488 nm の アルゴン
レ ー ザ ー で 励 起 し 、 630 nm の long pass filter を 用 い て $1 \sim 4 \times 10^4$ 個 の 細 胞 に つ き 核 DNA
量 を 測 定 し 、 ヒ ス ト グ ラ ム と し て 表 示 し た
(図 1 - a , b) 。

(4) 核 DNA 量 の 解 析

核 DNA 量 は DNA index (DI)¹⁰⁾ と し て 相 対 的
に 評 価 し た 。 コ ン ト ロ ー ル と し て 同 一 症 例 の
転 移 の な い リ ン パ 節 の 正 常 リ ン パ 球 を 同 様 に
処 理 し た も の を 用 い 、 こ の peak channel NO.
を 2c と 定 め 癌 細 胞 の G_0/G_1 の peak channel NO.
を コ ン ト ロ ー ル に 対 す る 比 率 で 表 し た 。 即 ち、

$$\text{DNA index (DI)} = \frac{G_0/G_1 \text{ の channel NO. }}{\text{コ ン ト ロ ー ル の channel NO. }}$$

で DI を算出した。この DI が 0.90 から 1.10 のものを diploid とし、それ以外を aneuploid と定め ploidy pattern 別に分類した (図 - 1)。なお、核 DNA 量の測定精度を表わす coefficient of variation (CV 値) は平均 6.6 ± 2.0 であった。

2) 癌細胞 ER の検索

手術時摘出した癌組織の一部 (約 0.5 g) を可及的速やかに凍結保存 (-80°C) し、enzyme immunoassay (EIA) 法にて SRL 社に委託し ER 測定を行なった。ER 13 fmol/mg 以上を陽性とした。なお、ER の測定が可能であった症例は 185 例中 108 例であった。

3) 病理組織学的検索

パラフィンブロックから核 DNA 量測定のため切り出した部位に隣接して $5 \mu\text{m}$ の切片を作成し、HE 染色標本を作成した。各々の症例について腫瘍部位では乳癌取扱い規約⁶⁾に基づいて組織学的分類を行ない、また腫瘍およびその周囲の LI について検討し^{3), 11)}、以下の

3 群 に 分 類 し た (写 真 2 - a , b , c) 。

L I 1 : リ ン パ 球 の 浸 潤 が 殆 ど 認 め ら れ
な い も の

L I 2 : 散 在 性 で は あ る が リ ン パ 球 の 浸
潤 が 比 較 的 密 に み ら れ る も の

L I 3 : 高 度 な リ ン パ 球 の 浸 潤 が 認 め ら
れ る も の

ま た 、 所 属 リ ン パ 節 に お い て は 組 織 学 的 リ ン
パ 節 転 移 度 ⁶⁾ の 他 、 S H 、 G C H に つ い て 検 討 し 、
各 々 以 下 の 3 群 に 分 類 し た (写 真 3 - a , b , c , お
よ び 4 - a , b , c) 。

S H 1 : S H が 殆 ど 認 め ら れ な い も の

S H 2 : 散 在 性 に S H の 認 め ら れ る も の

S H 3 : S H が 著 明 に 認 め ら れ る も の

G C H 1 : G C H が 殆 ど 認 め ら れ な い も の

G C H 2 : 散 在 性 に G C H が 認 め ら れ る も の

G C H 3 : G C H が 著 明 に み ら れ る も の

3 . 統 計 処 理

各 因 子 間 に お け る 有 意 差 検 定 は χ^2 検 定 法
に よ っ て 行 な っ た 。 ま た 、 生 存 率 の 判 定 、 及
び 解 析 は K a p l a n - M e i e r 法 に よ り 行 な っ た 。

Ⅲ . 結 果

1 . 全 症 例 の 解 析 結 果

核 DNA 量 の 解 析 を 行 な っ た 原 発 性 乳 癌 185 例
の う ち 、 d i p l o i d 例 は 85 例 45.9%、 a n e u p l o i d
例 は 100 例 54.1% で あ っ た 。 更 に 臨 床 病 期 別 に
a n e u p l o i d 例 の 出 現 率 を み て み る と (表 2) 、
I 期 で は 43 例 中 20 例 46.5%、 II 期 で は 78 例 中
40 例 51.2%、 III a 期 で 35 例 中 20 例 57.1%、 III b 期
で 16 例 中 12 例 75.0%、 IV 期 で は 13 例 中 8 例 61.5
% で あ り 、 III b 期 で I 期 、 II 期 に 対 し て a n e u -
p l o i d 例 の 出 現 率 が 高 か っ た ($p < 0.05$)。 そ の
他 の 群 で は 有 意 差 は な い も の の 臨 床 病 期 が 進
ん だ も の ほ ど a n e u p l o i d 例 の 出 現 率 が 高 く な
る 傾 向 が み ら れ た 。 閉 経 状 況 別 の a n e u p l o i d
出 現 率 は 閉 経 前 で 112 例 中 66 例 58.9%、 閉 経 後

では 73 例中 34 例 46.6%であり両群間に差は認められなかった。また、原発巣の ER 別でも、ER(+)で 54 例中 30 例 55.5%、ER(-)で 54 例中 31 例 57.4%と両群間に有意差は認められなかった。原発巣の組織型別では、充実腺管癌で 82 例中 47 例 57.3%、乳頭腺管癌で 45 例中 21 例 46.6%、硬癌で 39 例中 24 例 61.5%と硬癌でやや aneuploid 例の出現率が高かったものの、有意差は認められなかった。

病理組織学的予後因子との関連については、まずリンパ節転移度からみると n0 症例で aneuploid 出現率は 94 例中 45 例 47.9%、n1 α 症例で 45 例中 21 例 53.8%、n1 β 症例では 22 例中 14 例 63.6%、n2, n3 症例で 30 例中 20 例 66.6%とリンパ節転移度が高くなるにつれて aneuploid 出現率が高くなる傾向があり、特に n2, n3 症例における aneuploid 出現率は n0, n1 α 症例に比して有意に高かった ($p < 0.05$)。腫瘍およびその周囲へのリンパ球浸潤度との関連をみると、LI-1 では 48 例中 aneuploid 症例が 30

例 62.5%、LI-2では78例中aneuploid症例は44例56.4%、LI-3では59例中aneuploid症例は26例44.0%と統計学的有意差はないがリンパ球浸潤度の高いものほどaneuploid出現率が低くなる傾向がみられた。さらにSHとの関連はSH-1でaneuploid症例は17例中7例41.2%、SH-2でaneuploid症例は108例中59例54.6%、SH-3でaneuploid症例は60例中34例56.7%でありSHが著明な群でaneuploid出現率がやや高い傾向がみられたが有意差はなかった。また、GCHとの関連をみてみるとGCH-1でaneuploid症例は149例中80例53.7%、GCH-2でaneuploid症例は24例中14例58.3%、GCH-3でaneuploid症例は32例中6例18.7%であり、GCH-3でaneuploid出現率が有意に低かった($p < 0.05$)。

2. 患者の背景因子と予後との関連性

次に患者のそれぞれの背景因子について5年および10年生存率をみてみた。

1) DNA ploidy patternによる生存率およ

び 健 存 率 の 比 較

まず全症例の ploidy 別生存率は5年生存率では diploid 症例で 89.3%、aneuploid 症例で 75.1%、10年生存率では diploid 症例で 76.6%、aneuploid 症例で 49.9%と10年生存率において aneuploid 症例に対して diploid 症例が有意に ($p < 0.05$) 高値を示した (図 - 2)。また、ploidy 別に健存率¹⁾をみると、5年健存率では diploid 症例で 79.8%、aneuploid 症例で 65.3%、10年健存率では diploid 症例で 67.9%、aneuploid 症例で 51.4%と5年健存率において diploid 症例が有意に ($p < 0.05$) 高い健存率を示した (図 - 3)。

2) 臨床病理学的所見別にみた生存率

次に患者の臨床病理学的所見別に生存率をみた結果を表3に示した。まず、臨床病期別の生存率において、5年生存率は stage I で 100%、stage II では 88.9%、stage III a で 81.1%、stage III b で 43.5%、stage IV では 0%となっており、さらに10年生存率をみると stage I

で 79.6%、stage II で 73.9%、stage III aでは 47.4%、Stage III bで 43.5%であり、5年生存率では stage I, II と stage III b, IV との間に、10年生存率において stage I, II と stage III a以上との間で有意に ($p < 0.05$) 前者の生存率が高かった (図 - 4)。

ER別では ER(+)群の5年生存率 76.2%、10年生存率 76.2%、ER(-)群では 80.8%と 55.1%で有意差は認められなかった。

また、癌の組織型別では硬癌において5年生存率が 54.3%、10年生存率が 31.2%と他の組織型に比べて有意に生存率が低かった ($p < 0.05$)。組織学的リンパ節転移度については、転移度が高くなるほど生存率も有意に低値を示した。

腫瘍周囲のリンパ球浸潤度別では、5年生存率において差はみられなかったが 10年生存率においては LI-3が LI-1にくらべて有意に高値を示した (図 - 5)。SHの程度別では、SHが高度なほど高い生存率を示した (図 - 6)

。また、GCHについてはGCH-2は5,10年生存率はそれぞれ57.9%および28.2%であり、GCH-1やGCH-3より有意に($p < 0.05$)低い生存率であった(図-7)。

3. 癌進行度別の背景因子と予後との関連性
以上述べたように臨床病期別の生存率において、stage I, IIの早期の癌とstage III a以上の進行癌との間で生存率に有意の差が認められたので、解析した185症例を早期癌と進行癌に分けて、それぞれの背景因子と予後の関連性を比較検討してみた。

1) 早期癌(stage I, II)症例における検討
121症例のうち、aneuploid症例は60例49.6%であった。これらと病理学的因子との関連性をみてみると、SH、GCHの程度とaneuploid出現率に差はなかったが、腫瘍周囲リンパ球浸潤度では浸潤度が高くなるほどaneuploid出現率が低くなる傾向を認めた($p < 0.05$) (表4)。

Ploidy pattern別の5年生存率はdiploid症

例で95.9%、aneuploid症例で93.1%であり有意差はなかった。10年生存率でもdiploid症例で80.5%、aneuploid症例で69.1%とaneuploid症例で生存率は低かったが有意差はなかった(図8-a)。腫瘍周囲リンパ球浸潤度別では10年生存率においてLI-3症例がLI-1症例に対して有意に高値を示したが、その他の群では有意差は認められなかった(図8-b)。SHの程度からみるとSH-1が有意に低値を示し、また10年生存率においてSH-3がSH-2に対して有意に高値を示した(図8-c)。また、GCHの程度別では特に一定の関連性は認められなかった(図8-d)。

2) 進行癌(stage III a, III b, IV)症例における検討

進行癌においてaneuploid出現率は64例中40例62.5%であった。病理組織学的因子とaneuploid出現率との間には有意の関連性は認められなかったが、SHの程度が高いほどaneuploid出現率が高い傾向を認めた。GCHで

は両群共 GCH-1 が殆どで一定の傾向は認めなかった (表 5)。

これらの進行癌の ploidy pattern 別の生存率は図 9-a に示すように 5 年生存率で diploid 症例が 72.1%、aneuploid 症例が 49.1%、10 年生存率で diploid 症例が 72.1%、aneuploid 症例が 22.4% といずれも aneuploid 症例の生存率が有意に低値を示した ($p < 0.05$)。腫瘍周囲リンパ球浸潤度別ではいずれも有意差は認められなかった (図 9-b)。SH の程度からみると 5 年生存率において SH-3, SH-2, SH-1 の順に低くなり、有意に生存率に差がみられた (図 9-c)。また、GCH の程度別では特に一定の傾向は認められなかった (図 9-d)。

4. 原発巣とリンパ節転移巣の ploidy

pattern の比較

原発巣とリンパ節転移巣との核 DNA 量の解析を行なった 35 例を表 6 に示した。年齢は 30 歳から 62 歳までで、平均 46.0 ± 10.1 歳であり、閉経前 19 例、閉経後 16 例であった。臨床病期

分類は I 期 2 例、II 期 16 例、III a 期 9 例、III b 期 7 例、IV 期 1 例であった。原発巣の diploid 例は 35 例中 12 例 34.3%、aneuploid 例は 23 例 65.7%で、リンパ節転移巣においては diploid 例は 13 例 37.1%、aneuploid 例は 22 例 62.9%であった。これらの症例のうち、原発巣とリンパ節転移巣とで異なる ploidy pattern を呈した heterogeneity 症例は 13 例 37.1%に認められた(表 7)。次にこれらの症例と病理組織学的因子との関連をみると(表 8 - a, b, c)、まず腫瘍周囲のリンパ球浸潤度は原発巣が diploid pattern で、リンパ節転移巣も diploid のものはリンパ球浸潤度の高いものが多く(LI-3; 4/6 例)、リンパ節転移巣が aneuploid のものはリンパ球浸潤度の低いものが多い傾向があった(LI-1, 2; 6/6 例)が有意差はなかった。SH の程度では、原発巣が diploid でリンパ節転移巣も diploid のものに SH が高度にみられるものが多く(SH-3; 4/6 例)、リンパ節転移巣が aneuploid のものでは SH があまりみ

られないものが多かった (SH1, 2; 5/6例)。原発巣が aneuploidのものでは転移リンパ節の ploidy patternとの間に特に大きな差はみられなかった。また、GCHの程度では、いずれも GCHのみられない症例が多く特別の所見は得られなかった。

各々の ploidy pattern別に生存率をみると、原発巣が diploidで転移巣が aneuploidの群が他の群に比して有意に生存率が低かった ($p < 0.05$) (図 - 10)。その他の群では生存率に差は認められなかった。

5. 転移・再発症例の ploidy pattern

全症例 185例のうち、stage IVも含めて転移・再発の認められた例は 53例 28.6%であった。表 9 はそれらの症例の転移・再発部位別の ploidy patternを示したものである。局所再発での aneuploid出現率は 3例中 1例 33.4%であり、局所リンパ節再発での aneuploid出現率は 10例中 6例 60.0%であった。一方遠隔再発では骨転移例 12例中 5例 41.7%が aneuploid例であっ

たのに対し、肺転移では10例中9例90.0%、脳転移では7例中6例85.7%、肝転移では10例中7例70.0%と有意にaneuploid出現率が高かった($p < 0.05$)。

IV . 考 察

乳癌治療の最近の動向として診断技術の向上や集団検診の普及等により治癒可能な早期の乳癌症例の増加が挙げられ、そのような症例に対しては乳房温存術式をはじめとする縮小手術が行なわれるようになってきた。しかし、初治療時比較的早期の症例でも再発例が散見され、その一方で進行乳癌においては種々の集学的治療にも拘らず、生命予後はそれほど改善されていないのが現状である。このことから、癌細胞自体のもつ生物学的悪性度の検討が種々の方面でなされている。特に近年、癌細胞核DNA量は悪性腫瘍の生物学的悪性度を反映し予後を規定する一因子としての重要性が注目を集めている。1972年 Atkin¹⁾

は、67例の乳癌について落射型蛍光顕微鏡を用いて核DNA量を測定し、核DNA量の多い群は少ない群に対して8年生存率において有意に良好であると初めて報告した。そして1983年Hedleyら⁷⁾がパラフィン包埋標本よりflow cytometryを用いて細胞の核DNA量を測定する方法を発表し、これはすでに予後の判明している過去の症例に対しても測定が可能な方法であるため、核DNA量と予後との関連性のretrospectiveな研究が可能となった²⁾。

一方、腫瘍周囲のリンパ球浸潤や所属リンパ節反応は悪性腫瘍に対する個体の局所免疫応答として、宿主要因側からみた予後を表わす指標とされてきた。Blackら³⁾は胃癌手術症例120例について病理組織学的検討を行い、5年以上生存例では腫瘍周囲のリンパ球浸潤と所属リンパ節のSHが予後不良例によりも強くみられたと報告している。乳癌に関しての病理組織学的研究において、Cutlerら¹¹⁾は所属リンパ節のSHが著明なほど生存率が高い

と報告している。最近では免疫学的分野においてモノクローナル抗体を用いたリンパ球表面抗原の解析等で腫瘍周囲リンパ球の機能が解明されつつある⁴⁾。さらに Rosenberg ら⁵⁾は、この腫瘍周囲リンパ球 (TIL) を培養し、これが従来の lymphokine activated killer cell (LAK 細胞) よりも抗腫瘍性が高いことを指摘し治療面への応用に第一歩を踏み出した。また、Itoh ら^{1,2)}は悪性黒色腫の転移巣の TIL を自己腫瘍細胞と Interleukin-2 の存在下で混合培養し、自己腫瘍細胞に対して特異的に殺細胞性を発揮する T 細胞を得ており、さらに最近 Rosenberg ら^{1,3)}は転移性悪性黒色腫の治療に TIL を応用し奏効率 55% という良好な治療成績を報告している。

本実験の目的とするところは腫瘍要因であるところの核 DNA 量の予後因子としての重要性を検討するとともに、宿主要因として切除標本の病理所見を検討することにより、in vivo における乳癌の悪性度、進展形式を解明

することになった。

さて、185例の乳癌切除標本の核DNA量の検討では、aneuploid出現率が54.1%であったが、これは、これまでの報告にみられる50-90%の頻度と同程度である¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。Flow cytometryを用いた諸家の報告により aneuploid出現率に差がみられるのは、パラフィン標本より単離裸核細胞浮遊液を作製する過程で、正常細胞の混入が避けられず、癌細胞の数が相対的に少なくなってしまうこと、正常細胞に比べて大型の核をもつ癌細胞は裸核化不良になる恐れがあり、結果的に aneuploid出現率が低くなる傾向があると考えられる。これに対してはHE染色標本にて癌組織を確認し、確実に採取すると共に単離裸核細胞浮遊液を鏡検し確認することにより対処した。一般に flow cytometryにおいては細胞総数に対して癌細胞の割合が30%あれば aneuploidの検出は可能であるといわれている。核DNA量の測定精度を示すCV値は 6.6 ± 2.0 で満足すべきものであ

った。

臨床病期とaneuploid出現率との関係については、今回の検討では臨床病期が進んだものにaneuploid出現率が高値を示したが、同様の報告¹⁸⁾も、また臨床病期とaneuploid出現率に関連を認めないという報告¹⁹⁾もある。

各背景因子との関連についてみると、閉経状況、ER別ではaneuploid出現率に差を認めなかった。ERについてはER(-)例のaneuploid出現率が高いという報告が多い²⁰⁾⁻²³⁾が、これを否定する報告もある¹⁹⁾。

病理組織学的因子との関連については、組織学的リンパ節転移度が高くなるにつれaneuploid出現率も高値を示した。これは諸家の報告と一致した^{24), 25)}。組織学的リンパ節転移度が乳癌の予後因子として重要なことはよく知られており²⁶⁾、このことは核DNA量が予後因子として重要であることを示唆するともいえる。

一方、局所免疫応答としての腫瘍周囲リン

パ 球 浸 潤 度 と 核 DNA 量 と の 関 連 に つ い て 、 川
口 ら²⁷⁾ は 35 例 の 食 道 癌 に つ い て 顕 微 蛍 光 測
光 法 を 用 い て 核 DNA 量 を 測 定 し 、 diploid 症 例
に リ ン パ 球 浸 潤 が 高 度 の も の が 多 い と 報 告 し
て い る 。 こ の 中 で 癌 細 胞 に お け る 基 本 DNA 量
の 変 異 や 多 モ ー ド 化 の 現 象 に 癌 周 囲 環 境 に よ
る 修 飾 が 関 連 し て い る 可 能 性 を 示 唆 し て い る。
乳 癌 に お い て も 今 回 の 検 討 で 同 様 の 結 果 が 得
ら れ た 。

さ て 、 全 症 例 の 検 討 に お い て は diploid 症
例 が aneuploid 症 例 に 対 し て 高 い 生 存 率 、 健
存 率 を 示 し た が 、 ploidy pattern に よ る 生 存
率 の 違 い に つ い て は 差 が あ る と す る 報 告²⁸⁾、
²⁹⁾ も 差 が な い と い う 報 告³⁰⁾ も あ り 、 未 だ に
一 定 の 見 解 が 得 ら れ て い な い 。 原 因 と し て は、
標 本 処 理 の 方 法 、 解 析 方 法³¹⁾、³²⁾ な ど の te-
chnical な 問 題 も あ る だ ろ う が 、 対 象 症 例 の
臨 床 的 相 違 に よ る と こ ろ も 無 視 で き な い 。 す
な わ ち 、 臨 床 病 期 が 進 ん だ も の ほ ど aneuplo-
id 出 現 率 が 高 い の で あ る か ら 当 然 aneuploid

群の生存率は低くなる。そこで著者は臨床病期別生存率において有意差の認められるstageを早期群と進行群に分けて更に検討した。早期群においてはploidy pattern別に生存率の差は認められず進行癌において生存率に顕著な差がみられた。Winchesterら³³⁾はリンパ節転移陰性症例においてはploidy pattern別の生存率に差はみられなかったと報告した。また、反対にリンパ節転移陰性のもので核DNA量と予後との関連がみられたという報告もある^{34), 35)}。西ら³⁶⁾によると、リンパ節転移陰性症例に対しては核DNA量と生存率に関連はみられず、転移陽性例のある程度病期が進行したものでは、核DNA量と生存率に関連がみられたという。病期別のaneuploid出現率の違いと共に、このことから癌の時間的経過に伴う生物学的悪性度の変化がおこっていることも考えられる。また、早期癌においては腫瘍周囲のリンパ球浸潤とaneuploid出現率に関連がみられたが、これは宿主側の癌

に対する免疫応答が癌細胞の核DNA量の変異に何らかの影響を与えているのかもしれない。進行癌には腫瘍周囲リンパ球浸潤度とaneuploid出現率に関連がみられないことから癌の進行に伴って宿主の免疫反応も変化してくることが考えられる。

一方、病理学的予後因子として知られている所属リンパ節反応との関連についてであるが、SHは細胞性免疫反応(T-cell系)の、GCHは液性免疫反応(B-cell系)の表現であるとされている^{37), 38)}。SHについては前述したようにCutlerら¹¹⁾は予後良好の指標と指摘しており、著者の検討でもSHが高度にみられるものの程生存率が高い傾向にあった。全症例を早期癌、進行癌に分けて検討した結果でも、特に進行癌において高度例の予後が有意に良好であった。SHとaneuploid出現率との関連をみてみると有意差はないもののSHが高度のものほどaneuploid出現率が高い傾向にあった。両者を予後の単独因子と考えると一見矛

盾した結果のようであるが、aneuploidの癌細胞でも腫瘍の抗原性が高いものがあり、それが所属リンパ節になんらかの働きかけをしている可能性も考えられる。GCHについても予後良好の指標であるという報告が多い³⁸⁾が、液性免疫に関連する抗体が必ずしも抗腫瘍性に働くかどうかについては疑問を投げかける向きもあり、Hunterら³⁹⁾は乳癌においてGCHはむしろ予後に悪く影響する因子であると報告している。著者の検討でもGCH-3例が早期癌でも121例中11例(9%)、進行癌でも64例中僅か1例(2%)にしか認められなかったこと、aneuploid出現率、生存率との間に一定の傾向がみられなかったことなどから、GCHに表現される宿主におけるB-Cell系の機能は必ずしも直接抗腫瘍性に関連しない因子とも考えられる。

同一個体における癌細胞のheterogeneityの存在が知られているが⁴⁰⁾⁻⁴²⁾、生物学的悪性度からみた原発巣とリンパ節転移巣の

heterogeneityの解析の報告は比較的少ない⁴³⁾。Christovら⁴⁴⁾は34例のリンパ節転移陽性乳癌について原発巣とリンパ節転移巣との核DNA量を測定し34例中9例26.4%のploidy patternの不一致があったと報告している。このheterogeneityの原因として癌細胞自体が非常に不安定で発育、転移の段階で種々の原因により変化することが考えられるとしている。しかし一方で山口ら⁴⁵⁾は、大腸癌の肝転移例の核DNA量の検討において20%の症例でみられたheterogeneityの原因として、原発巣内に既にみられる複数のstem cell lineのうち、aneuploid patternを有する癌細胞がその生物学的特性として肝に転移、着床しやすいためではないかとしている。いずれにしても転移・増殖のメカニズムには宿主要因が絡んでくることは当然考えられ、原発巣と転移巣とのploidy patternと病理学的にみた宿主要因との関連では、原発巣のploidy patternがdiploidのもので転移巣もdiploidの

ものは腫瘍周囲のリンパ球浸潤が著明にみられるものが多くSHの程度も高度なものが多いが、転移巣がaneuploidのものはリンパ球浸潤度、SHの程度が低いものが多かった。このことは、癌細胞の所属リンパ節への転移に何らかの形で宿主の免疫応答が関与しているか、あるいは癌細胞の生物学的悪性度が宿主の免疫応答に影響していることを示唆する所見といえよう。

各群の生存率をみると、原発巣がdiploidでリンパ節転移巣がaneuploidのものが他群に比して低い生存率であった。先にも述べた通り原発巣のaneuploid症例はdiploid症例に比して生存率が低かったが、癌の進行、転移に伴うheterogeneityの出現による生存率の違いは核DNA量が予後因子としてさらに重要なものとなる可能性を示唆すると思われる。

さて、乳癌の転移・再発についてHaagen-senら^{4,6)}は、局所再発は術者の手術手技の不満足か、あるいは局所再発を余儀なくされる

ような症例に手術を施行したという選択（適応）の誤りのいずれかであるといい、悪性度との関連性を否定している。また、草間⁴⁷⁾は癌細胞の doubling time の研究において、殆どの遠隔転移巣はその発見時点から逆算すると、初回治療時に既にその転移は始っていたとする根拠をあげている。今回著者の検討では局所再発においては原発巣の aneuploid 出現率は低く、遠隔臓器の転移、再発例においては骨を除き肺、脳、肝でいずれも aneuploid 出現率は有意に高かった。このことは、aneuploid の癌細胞が遠隔臓器に転移しやすい生物学的に悪性度の高い性質をもつことを示唆するものといえる。

以上の結果を総括すると、乳癌における癌細胞核 DNA 量の aneuploid 症例は臨床病期とリンパ節転移度が進行するにつれ、その頻度が増加し、予後の面から検討しても aneuploid 症例の予後は diploid 症例に比べ有意に低く、ことに進行癌でその差が明らかになった点か

ら、DNAの ploidy patternは進行癌の予後因子として重要であるといえる。また、遠隔臓器の転移、再発例で aneuploid症例が極めて高率であったことは、遠隔転移の予想因子としても重要と考える。

一方、宿主の癌に対する免疫学的応答能の一つとされる腫瘍周囲リンパ球浸潤度の高いものでは aneuploid症例が少なく、LI高度例の予後が有意に良好な事と相関した。但し、SH, GCHでは必ずしも関連性を認め得ず、今後更に症例を重ね、浸潤リンパ球の subsetの検討を含め、より詳細な検討が必要であろう。この事は原発巣とリンパ節転移巣の heterogeneityを検討した結果でも、原発巣が diploidでリンパ節転移巣が aneuploidの例で生存率が低くLI, SHの低反応例が多いのに対し、両者が diploidのものは予後良好でLI-3とSH-3が多い点を併せ考えると、癌細胞側の要因と宿主側の防御要因は heterogeneityの少ない癌にのみ発揮されていることも考えられる

が、今後なお検討していかなければならない相互に錯綜した問題が存在するようである。

又、今回はまだ少数例のため検索項目に加えなかったが、最近、著者の教室では乳癌患者に対し進行度別の化学療法、内分泌療法、更には免疫療法を系統的に併用しているので、これらの治療効果と癌細胞核DNA量との関連性をみることも将来の課題となろう。

V . 結 語

乳癌の癌細胞核DNA量を測定し、臨床病理学的所見との関連性、予後との関連性について検討し以下の結果を得た。

1 . 原発性乳癌185例のaneuploid出現率は54.1%であり、臨床病期、組織学的リンパ節転移度が進行するにつれて、その頻度が増加した。

2 . 腫瘍周囲のリンパ球浸潤度の高いものはaneuploid出現率は低かった。

3 . 生存率、健存率では aneuploid 症例が diploid 症例に対して低値であった。

4 . 全症例を早期癌と進行癌に分けたところ、早期癌では ploidy pattern 別の生存率に有意差はなかったが、進行癌では diploid 症例の生存率が有意に高かった。

5 . 原発巣とリンパ節転移巣との間には 37.1% の heterogeneity が認められた。それぞれの群で生存率をみると原発巣が diploid で転移巣が aneuploid のものが他群に比して生存率が低かった。それに対し、両者とも diploid pattern を呈したものは予後も良く、LI, SH 高度のものが多かった。

6 . 転移・再発症例 53 例で核 DNA 量を測定したところ、局所再発では aneuploid 出現率が 33.3% であったのに対し、肺、脳、肝への遠隔臓器転移・再発例での aneuploid 出現率は有意に高かった。

文 献

- 1) Atkin, N. N. : Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. Brit. Med. J. 29: 271-272, 1972
- 2) Barlogie, B., Raber, M. N., Schumann, J., et al. : Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res. 43: 3982-3997, 1983
- 3) Black, M. M., Opler, S. R., Speer, F. D. : Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. Surg. Gyn. Obst. 98: 725-734, 1966
- 4) 菊池浩吉 : 癌組織におけるリンパ球浸潤の臨床的意義. 外科診療 : 1839-1848, 1982
- 5) Rosenberg, S. A., Spiess, P., Lafreniere, R. : A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 233: 1318-