

Flow Cytometry を用いた精巣腫瘍 パラフィンブロックによる Ploidy の検討

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

吉弘 悟, 山本 光孝, 島袋 智之
松山 豪泰, 山本 憲男, 酒徳治三郎

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF DNA PLOIDY USING PARAFFIN-EMBEDDED GERM CELL TUMORS

Satoru Yoshihiro, Mitsutaka Yamamoto, Tomoyuki Shimabukuro,
Hideyasu Matsuyama, Norio Yamamoto and Jisaburo Sakatoku

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

The DNA content of paraffin-embedded materials was determined retrospectively using flow cytometry (FCM) in 36 germ cell tumors, and related to histological type, clinical staging and tumor marker. These histograms were classified from the basis of mode and variance into a diploid and an aneuploid pattern. We could evaluate the DNA histograms in 20 of 36 specimens (56%). Aneuploid patterns were found in 11 of 20 evaluated cases, but there was no correlation between ploidy patterns and histological types. Aneuploid patterns were demonstrated in 2 of 6 stage I cases (33%), and 4 of 5 stage II cases (80%) in seminomas. The difference between stage I and II cases was not statistically significant. There was no correlation between clinical staging and DNA content in non-seminomas. Of the seminomas with elevated human chorionic gonadotropin (HCG) titers, 3 of 4 cases showed aneuploid patterns. These findings indicate that the determination of DNA ploidy in seminomas may prove to be of prognostic value.

(Acta Urol. Jpn. 37: 601-605, 1991)

Key words: FCM, Germ cell tumor, DNA ploidy

緒 言

すでに臨床経過の明らかな患者のパラフィン包埋ブロック内組織の核 DNA 量を flow cytometry (以下 FCM) を用いて測定することで, DNA ploidy が予後推定因子となりうるかどうかを検討できる。

近年, 各種固形腫瘍について核 DNA 量の解析が行われ, 悪性度を表わすマーカーの 1 つとして DNA aneuploidy が一般に用いられるようになってきた。当科でも, すでに腎癌および膀胱癌のパラフィンブロックを用いて核 DNA 量を測定し, DNA ploidy と悪性度および予後との関連性について報告をしてきた¹⁾。

今回, 精巣腫瘍のパラフィンブロックより FCM を用いて核 DNA 量を測定し, ploidy と予後因子について検討したので報告する。

対象と方法

1975年1月から1988年8月までの14年8カ月間に, 山口大学泌尿器科学教室にて, 高位除根術を施行した精巣腫瘍36例の57検体を検討対象とした。年齢は, 0歳から52歳で平均21.7歳であった。精巣腫瘍取り扱い規約²⁾による組織型の内訳は, seminoma 11例, teratoma 7例, embryonal carcinoma 3例, その他15例であった (Table 1)。また, seminoma は全例とも typical seminoma であった。

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして保存されていた精巣組織を 5 μm および 40 μm に薄切した。前者は, 通常の HE 染色を行い, あらためて組織学的検討を行った。FCM 用の検体は, Hedley ら³⁾の方法に準じて作成した。すなわち 40 μm の薄切標本を Histoclear にて脱パラフィンした後, 100%, 95%, 75%, 50%エタノールで再水和した。つぎ

に、0.25% trypsin with spermine にて 37°C overnight 処理¹⁾した後、Vindeløv ら²⁾の方法に準じ RNase 処理後、Propidium Iodide にて核の DNA 染色を行った (Fig. 1).

Flow cytometer は、Coulter 社の EPICS-753 を使用し、30,000個の核 DNA 量を測定し DNA ヒストグラムを作成した。

DNA ploidy の判定は、単一の G₀/G₁ peak を有するものを diploid pattern とし、複数の G₀/G₁ peak を有するものを aneuploid pattern とした。

Table 1. Pathological types and % of evaluated cases

Pathological type	% of evaluated cases (case No.)
Seminoma	100% (11/11)
Non-Seminoma	36% (9/25)
teratoma	14% (1/7)
embryonal ca.	33% (1/3)
teratoma and others	57% (4/7)
choriocarcinoma and any	
other types	66% (2/3)
other combinations	20% (1/5)
total	56% (20/36)

We could evaluate the DNA histograms in 20 of 36 specimens (56%). In seminoma all cases were evaluated, but only 9 of 25 cases (36%) were evaluated in non-seminoma.

また DNA ヒストグラムの解析に際して、ヒストグラムの変異係数 (coefficient of variation; CV) が 15%以上のもの、あるいは明らかな G₀/G₁ peak の認められなかったものは、解析不能症例として検討対象から除外した。検定は χ^2 検定、Fisher's exact probability test を用いた。

結 果

DNA ヒストグラムは、検討した 36 例中 20 例 (56%) で解析可能であり、年齢は 21 歳から 46 歳 (平均 29.7 歳)、CV 値は 2.7% から 9% であった。組織型では seminoma が 100% 解析できたのに対して、non-seminoma では 36% と低かった。特に teratoma では、他の element が存在した場合が 57% 解析可能であったのに対し、pure teratoma では 17% となり解析可能症例が少なくなった (Table 1)。

DNA aneuploidy は、55% (20 例中 11 例) で認められた。組織型を seminoma と non-seminoma に大別すると、seminoma で diploid pattern (Fig. 2) を示したのは 45% (11 例中 5 例) であったのに対し、aneuploid pattern (Fig. 3) は 55% (11 例中 6 例) であった。一方、non-seminoma で diploid pattern (Fig. 4) を示したのは 45% (9 例中 4 例) であったのに対し、aneuploid pattern (Fig. 5) は 55% (9 例中 5 例) であった。したがって、seminoma と non-seminoma の間で組織型の違いによる aneuploidy の出現頻度に差はなかった。

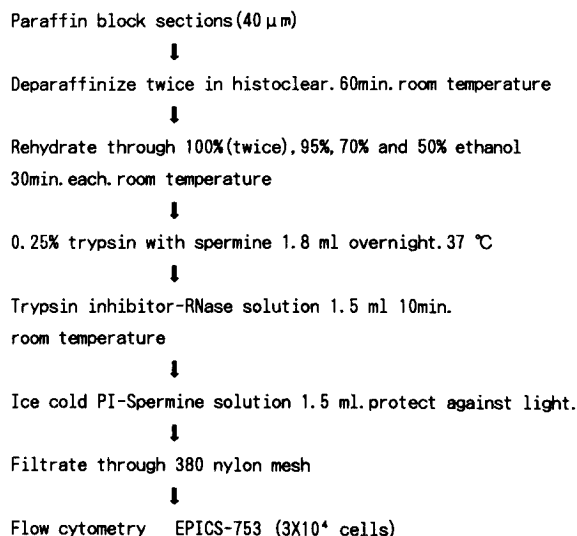


Fig. 1. Preparation of single cell suspensions from paraffin-embedded materials.

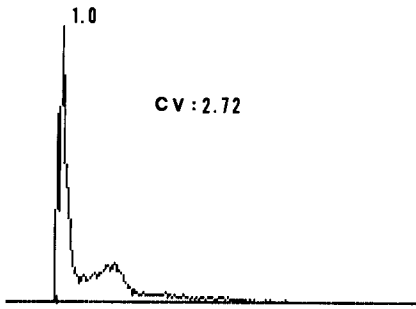


Fig. 2. Seminoma: diploid pattern (CV=2.72)

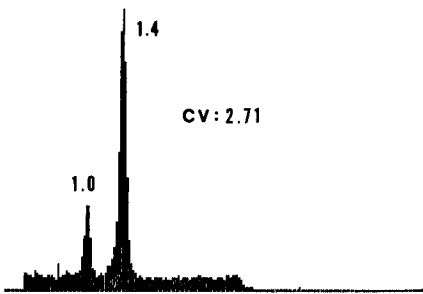


Fig. 3. Seminoma: non tetraploid aneuploid pattern (CV=2.71, DNA Index of aneuploid peak is 1.4)

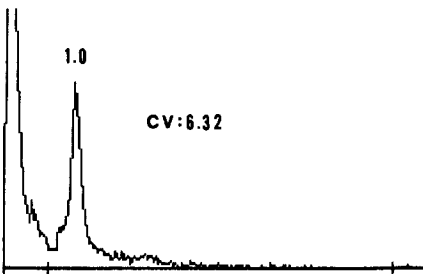


Fig. 4. Non-seminoma: diploid pattern (CV=6.32)

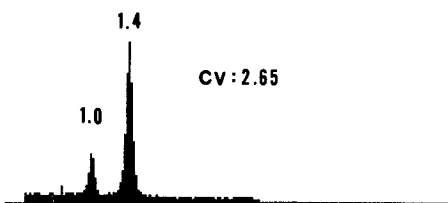


Fig. 5. Non-seminoma: non tetraploid aneuploid pattern (CV=2.65, DNA Index of aneuploid peak is 1.4)

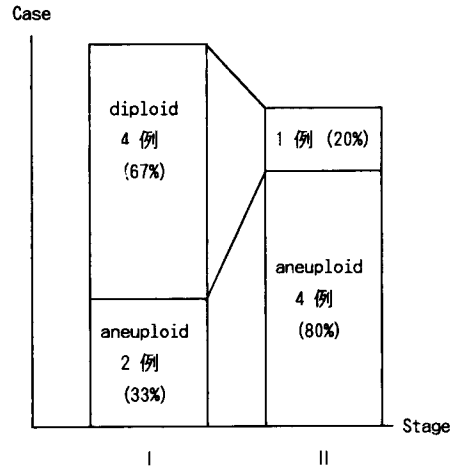


Fig. 6. DNA ploidy and clinical stage (seminoma). Aneuploid patterns were demonstrated in 2 of 6 stage I cases, 4 of 5 stage II cases, but statistically was not significant.

Table 2. Ploidy and stage of HCG-β positive seminoma. In HCG-β positive seminoma 3 of 4 cases (75%) showed aneuploid pattern.

DNA ploidy	Stage	
	I	II
Diploid	1 (25%)	1
Aneuploid	3 (75%)	2
total	4	3

DNA ploidy と精巢腫瘍取り扱い規約による臨床病期との関係を Fig. 6 に示した。seminoma では、stage I で33% (6例中2例) に aneuploid を認めただのに対し、stage II では80% (5例中4例) と aneuploid の出現頻度が stage I に比べ高かったが、統計学的な有意差は認められなかった。一方 non-seminoma では、各病期における aneuploid の出現頻度には一定の傾向を認めなかった。

術前に血清 HCG-β 値の上昇を認めた seminoma 症例は11例中4例で、うち3例が stage II であった。これら4例についての臨床病期と ploidy との関係を Table 2 に示した。すなわち、HCG-β 値が正常であった seminoma 症例の43% (7例中3例) に aneuploid が認められたのに対して、HCG-β 上昇例では75% (4例中3例) と aneuploid の出現頻度

が高かった。また各病期における aneuploid の出現頻度には有意差を認めなかった。

考 察

FCM の出現により、多数の腫瘍細胞集団の細胞核 DNA 量を客観的ならびに、迅速かつ定量的に測定できるようになってきた。1983年 Hedley ら³⁾が、ヒト固型腫瘍のパラフィン包埋ブロックから核懸濁液を調整し、FCM により核 DNA 量を測定する方法を報告して以来、多くの腫瘍で核 DNA 量の解析が retrospective な形で行われるようになってきた。この方法は、すでに臨床経過の明らかな患者を対象とすることができるため、腫瘍の組織学的異型度や臨床病期はもとより、長期間にわたる再発および生存率の検討と DNA ploidy との関係を比較できる画期的な方法である。泌尿器科領域においても、すでに腎癌、膀胱癌、前立腺癌のパラフィン包埋組織を用いて核 DNA 量の解析を行った報告は多数みられるようになってきた^{1,6)}。しかしながら、精巣腫瘍についての報告はいまだ少ない。さらに、パラフィン包埋組織を用いて、retrospective に DNA ploidy を解析する本方法は、精巣腫瘍の発現率が少ないことを考えあわせると、多くの症例を集めることが可能という点でも優れた方法であると考えられる。

精巣腫瘍の DNA ploidy の検討では、今だに aneuploid の出現頻度に確定的な報告はなく、90%以上に認められたというものから60%前後というものまで様々である⁶⁻¹⁰⁾。Zimmerman⁶⁾は、18例の精巣腫瘍新鮮検体を用いて DNA ploidy を解析した結果94% (17例)に aneuploid を認めたとしている。また Quirke ら⁷⁾は、63例の精巣腫瘍 (パラフィン包埋組織34例、新鮮検体29例)を用いて DNA ploidy の解析を行った結果、seminoma では新鮮検体で50% (14例中7例)、パラフィン包埋組織で78% (14例中11例)に aneuploid を認めたと報告している。今回のわれわれのパラフィン包埋標本を用いた検討では、55% (36例中20例)で DNA ヒストグラムが解析可能であり、さらにその中の55% (20例中11例)に aneuploid を認めた。組織型別の aneuploid の出現頻度を比較検討すると、seminoma と non-seminoma ではその出現頻度はともに55%となり組織型による差はなかった。

つぎに、臨床病期と DNA ploidy との関係を検討した結果、seminoma においては stage I で aneuploid の出現頻度が33%であるのに対して、stage II では80%と aneuploid の出現頻度が高くなっていた。

われわれの他の尿路腫瘍での病期と aneuploid の出現頻度の検討結果¹⁾では、腎癌の stage III 以下18%、stage IV 33%、膀胱癌の low stage (T₁ 以下)10%、high stage (T₂ 以上)47%で、病期との関連性が認められた。また non-seminoma では、各病期における aneuploid の出現頻度には一定の傾向は認められなかった。これは DNA ヒストグラムの解析可能症例が、non-seminoma に関しては少なく、特に teratoma で17%と低かったためではないかと考えられたが、原因については不明である。

一般に悪性腫瘍の DNA ヒストグラムを解析する場合、ploidy の他に DNA index (DI), proliferative index (PI) などの各種パラメーターを用いて、組織学的悪性度や予後との比較検討が行われることが多い。精巣腫瘍の場合は、他の悪性腫瘍に比べて症例数が少ないうえに、比較的早期に発見されることが多い。さらに化学療法による治癒率が高いことなどのために、ploidy と予後との比較を行ううえで症例がたより解析が難しくなる。Zimmerman⁶⁾は、ほとんどが早期癌症例であったため、また Quirke ら⁷⁾は、化学療法の有効率が高いことを理由に生存率との比較は行っていない。一方、Slidge ら^{11,12)}は、50例の精巣腫瘍 (stage II_B 以上)のパラフィンブロックを用いて DNA ヒストグラムを解析し、各種パラメーターと予後との比較を行なっている。彼らの報告によると diploid であった7例中6例(86%)が2年以上生存していたのに対し、aneuploid を示した症例では38例中21例(55%)と生存率が低くなっていたが、統計学的に有意差はなく、DI と予後との間にも一定の傾向を認めなかったと報告している。しかしながら、PI と予後を比較したところ、PI が低かった症例の平均生存期間が85.6±7.6カ月であったのに対し、PI が高かった症例のそれは37.7±11.0カ月であり、PI の高い症例の予後が有意に悪かったと報告している。今回のわれわれの検討では、全例とも生存中であったため ploidy と生存率を比較するには至らなかった。

精巣腫瘍における血清 HCG 陽性例と陰性例の予後に関して Wilson ら¹³⁾は、seminoma 50例中 HCG 陰性44例には死亡例を認めなかったが、陽性6例中2例の死亡を認めたとしている。また Morgan ら¹⁴⁾も血清 HCG の陽性の seminoma 14例を検討した結果、5例の死亡を認め予後不良であったとしている。しかしながら、最近の報告^{15,16)}によると血清 HCG-β の上昇は予後不良因子ではないとするものも多く、桜本ら¹⁷⁾も血清 HCG 陽性例の予後は stage に関係しており進行例が多いために予後が悪いというべきである

としている。われわれも血清 HCG- β 陽性の seminoma 例の DNA ploidy を検討した結果, 4 例中 3 例 (75%) に aneuploid を認め, seminoma 全体の 11 例中 6 例 (55%) に比べると, aneuploid の出現頻度が高かった。しかしながら, HCG 陽性例は seminoma 全体と比べると stage II 症例の割合が高く, このために aneuploid の出現頻度が高くなったとも考えられた。最後に今回 DNA histogram が解析可能であった精巣腫瘍に死亡例がなかったため, 予後との比較はできなかったが, 今後さらに症例を重ねることで seminoma での DNA ploidy 測定が予後推定因子となりうる可能性が示された。

結 語

精巣腫瘍 36 例の パラフィンブロックを用いて, FCM による核 DNA 量解析を行い, 以下の結果と展望を得た。

- 1) DNA ヒストグラムは全体で 36 例中 20 例 (56%) で解析可能であったが, teratoma では他の組織型に比べて解析不能症例が多かった。
- 2) DNA aneuploidy の出現は 20 例中 11 例 (55%) に認められたが, seminoma と non-seminoma で組織型の違いによる差はなかった。
- 3) seminoma は, stage の進行に伴い aneuploid の出現頻度が高くなる傾向が認められた。
- 4) HCG- β 値の上昇を認めた seminoma では, 4 例中 3 例 (75%) に aneuploid が認められ malignant potential が高いのではないかと推定された。
- 5) 今後さらに症例をかさね, 精巣腫瘍の予後および腫瘍マーカーとの関連性において DNA ploidy を検討したい。

本論文の要旨は, 第 77 回日本泌尿器科学会総会 (大阪) において発表した。

文 献

- 1) 山本光孝, 三井 博, 松山豪泰, ほか: FCM を用いた尿路悪性腫瘍のパラフィンブロックによる Ploidy の検討. 日癌治 23: 2121, 1988
- 2) 日本泌尿器科学会, 他編: 睾丸腫瘍取り扱い規約. 84-85, 金原出版, 東京, 1984
- 3) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333-1335, 1983
- 4) Vindeløv LL, Christensen IJ and Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3: 323-327, 1983
- 5) Lee SE, Currin SM, Paulson DF, et al.: Flow cytometric determination of ploidy in prostatic adenocarcinoma: a comparison with seminal vesicle involvement and histopathological grading as a predictor of clinical recurrence. J Urol 140: 769-773, 1989
- 6) Zimmerman A: Aneuploid in malignant tumors of the testis and their lymphatic metastasis. Urologe A 19: 391-396, 1980
- 7) Quirke P, Dyson JED, Sutton J, et al.: Assessment of germ cell tumors of testis by flow cytometry and histopathology. Adv Biosci 55: 45-54, 1986
- 8) Barlogie B: Abnormal cellular DNA content as a marker of neoplasia. Eur J Cancer Clin Oncol 20: 1123-1125, 1984
- 9) Fossa SD, Pettersen ED, Thorud E, et al.: DNA flow cytometry in human testicular cancer. Cancer Lett 28: 55-60, 1985
- 10) Oosterhuis JW, Castedo SMMJ, Jong B, et al.: Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Lab Invest 60: 14-21, 1989
- 11) Sledge GW Jr, Eble JN, Roth BJ, et al.: Flow cytometry derived DNA content of the primary lesions of advanced germ cell tumours. Int J Androl 10: 115-120, 1987
- 12) Sledge GW Jr, Eble JN, Roth BJ, et al.: Rerotation of proliferative activity to survival in patients with advanced germ cell cancer. Cancer Res 48: 3864-3863, 1988
- 13) Wilson JM and Woodhead DM: Prognostic and therapeutic implications of urinary gonadotropin levels in the management of testicular neoplasia. J Urol 108: 754-756, 1972
- 14) Morgan DAL, Caillaud JM, Bellet D, et al. Gonadotropin-producing seminoma A distinct category of germ cell neoplasm. Clin Radiol 33: 149-153, 1982
- 15) Swartz DA, Johnson DE and Hussey DH: Should an elevated human chorionic gonadotropin titer alter therapy for seminoma? J Urol 131: 63-65, 1984
- 16) Mirimanoff RO, Shipley WU, Dosoretz DE, et al.: the result of radiation therapy in patients with elevated human chorionic gonadotropin titers. J Urol 134: 1124-1126, 1985
- 17) 桜本敏夫, 木原和徳, 河合恒雄, 成人睾丸腫瘍の臨床的検討. 泌尿紀要 30: 639-649, 1984
(Received on July 12, 1990)
(Accepted on October 28, 1990)