

ヒトおよび実験大腸癌の核 DNA 量に関する研究

山口大学医学部外科学教室第2講座（指導：石上浩一教授）

長谷川 博 康

〔原稿受付：昭和60年8月26日〕

A Microphotometric Study on the Nuclear DNA Content in Cells of Human and Experimental Large Intestinal Carcinomas

HIROYASU HASEGAWA

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Yamaguchi University
(Director: Prof. Dr. KOICHI ISHIGAMI)

The nuclear DNA content of 5 normal epithelia, 7 adenomas and 31 carcinomas of the large intestine in humans was measured and the correlation between the DNA distribution pattern and histologic findings was evaluated.

In the nuclear DNA content there was not a statistical difference between normal epithelia and adenomas, but a significant difference between adenomas and carcinomas ($p < 0.01$) was found.

The borderline lesions were classified as benign or malignant based on their DNA distribution patterns. The results showed that the tumors larger than 2.9 c in the mean DNA content, 36.0% in the percent-over-3 c value and 3.9% in the percent-over-4 c value were regarded as carcinoma.

The nuclear DNA content of 31 carcinomas was compared with 8 prognostic factors to investigate whether the nuclear DNA content in cancer cells reflects the degree of clinical malignancy. The mean DNA content in histologic differentiation and the peak DNA content in vascular invasion had a significant difference ($p < 0.05$).

The nuclear DNA content of 5 normal epithelia and 24 tumors induced with 1,2-dimethylhydrazine of the large intestine in rats was measured and the correlation between the DNA distribution patterns and histologic findings was evaluated. The results showed that the nuclear DNA content tended to increase with an increase in atypia. This gradation was useful in determining the process by which large intestinal adenoma transforms into carcinoma.

Key words: Adenoma of the large intestine, Carcinoma of the large intestine, Experimental carcinoma of the large intestine, Nuclear DNA content, DNA histogram.

索引語：大腸腺腫，大腸癌，実験大腸癌，核 DNA 量，DNA ヒストグラム。

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Yamaguchi University, 1144 Kogushi, Ube 755, Japan.

I はじめに

大腸癌は欧米では代表的な消化器癌の1つであるが、最近、日本においても食生活の変化に伴いその発生率の増加がみられている。今回、ヒトおよびラット実験大腸癌について組織学的検討を加え、さらに正常上皮や腺腫も含め、良悪性境界、異型度、予後因子、癌発生機構などについて核 DNA 量の面から比較・検討を行った。

DNA は染色体に局在し、遺伝情報の担い手となるだけでなく、細胞の増殖にも関与していることは周知のことである。核内における DNA 含有量は染色体1組ごとに決った値をとり^{3,9)}、また、正常細胞における1細胞核あたりの DNA 量は種によって一定の値をとる^{18,29)}といわれている。腫瘍細胞においては、染色体の数、形態などに種々の変化をきたし³⁹⁾、核内 DNA 量も正常細胞のそれより多く、かつ変化に富んでいることが知られている^{18,24)}。この核 DNA 量を測定することにより、大腸腫瘍における良悪性境界をある程度見出すことができ、前癌病変といわれている腺腫や異型腺管巢についても細かく検討することが可能ではないかと考えた。

II 対象および方法

1. 対 象

1) ヒト大腸腫瘍

昭和54年1月より56年12月までに山口大学第2外科

で行った手術症例のうち、術前療法の影響がなく、病理組織学的所見を正確に観察できた大腸癌31例（結腸癌15例、直腸癌16例）を対象として、核 DNA 量を測定した。さらに、大腸正常上皮5例、大腸腺腫7例についても同様に測定した。また、大腸腺腫7例はすべて腺腫性ポリープであった。

2) 実験大腸腫瘍

実験動物は生後6週令のウィスター系ラット雄20匹を用い、発癌剤は1, 2-dimethylhydrazine (N-N'-dimethylhydrazine dihydrochloride 半井化学, 京都, 以下 DMH と略す) を使用した。生理食塩水 100 ml 中に DMH 350 mg と Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) 1,500 mg を溶解し、さらに 2N NaOH にて pH 6.5 となるように調製した。この溶液を用い、ラット腹部皮下に DMH 20 mg/kg を週1回、20週間投与した。対照群5匹には発癌剤を投与しなかった。またラットは水道水および MF 固型飼料（オリエンタル酵母株式会社）にて飼育し、実験開始後25週目より適宜屠殺した。

2. 方 法

ヒト大腸腫瘍については、切除された標本を10%ホルマリン液で固定したのち、パラフィン包埋した。実験大腸腫瘍については、まずラット大腸を腸間膜附着部に沿って切開し、盲腸は腸間膜附着部と反対側で切開した。大腸を充分に伸展した後、肉眼的に判別しうるすべての隆起性病変を切除し、10%ホルマリン液で固定したのち、パラフィン包埋した。各包埋ブロック

表1 細胞分離の操作

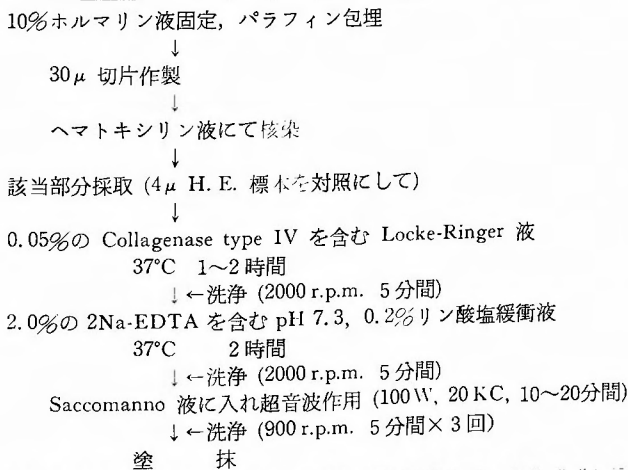


表2 Feulgen 染色

| |
|--------------------------|
| 標本を蒸留水で水洗 |
| ↓ |
| 25°C の 5 N HCl で50分間加水分解 |
| ↓ |
| 蒸留水で水洗 |
| ↓ |
| 室温で60分間, Schiff 試薬と反応 |
| ↓ |
| 亜硫酸溶液で2分ずつ3回洗浄 |
| ↓ |
| 蒸留水で水洗 |
| ↓ |
| 脱水, 透徹, 封入 |

について厚さ 4μ と 30μ の2種類の切片を交互に作成し, 4μ の切片はヘマトキシリン・エオジン染色 (H. E. 染色) を施して組織学的検索に供した. 30μ 切片は芦原ら²³⁾の方法にて細胞分離操作を行うことにした (表1). 30μ 切片にヘマトキシリン染色を施し, 組織構造が明確になるようにし, 4μ の H. E. 標本を顕微鏡下で観察・確認した後, 30μ 切片を40倍で鏡検しながらリンパ球も充分含まれるように測定対象部位から細胞を採取した. ラット標本では測定対象部位にリンパ球が充分含まれていなかったため, 同一ラットの正常リンパ節の 30μ 切片を作成し, 測定対象部位に混じて細胞分離操作を行った. 表1のように, 0.05% Collagenase type IV, 2Na-EDTA, および超音波などにて細胞分離後, スライドガラス上に塗抹された細胞を友永ら^{30,31)}の方法に準じて Feulgen 染色を施し (表2), 核 DNA 量を測定した.

核 DNA 量測定は, 走査型顕微濃度計 (ニコンビッカーズ M85) を用いて行った. 吸光測光に用いた単色光の波長は 560nm である. 400倍の観察系で, よく分離された細胞で核の重なりや変形がないことを確認したのち, 光路を測光系に変更して, 核 DNA 積

分量を測定した. 各標本ごとに腫瘍細胞150個, 小リンパ球50個を測定した. 50個の小リンパ球の核 DNA 量の平均値を $2c$ (2倍値) とし, 腫瘍細胞の核 DNA 量を $2c$ に対する相対量値で表現して核 DNA 量の分布状態を示す核 DNA ヒストグラムを作製した. 各々の病変について核 DNA 量の平均値, 最頻値, 分散幅 (最低値と最高値の差), over $3c$ (3倍値を越える核 DNA 量を有する細胞核数の百分率), over $4c$ (4倍値を越える核 DNA 量を有する細胞核数の百分率) を求め, 比較・検討した. 統計処理は Student's t-test を用い, $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした.

III 結 果

1. ヒト大腸腫瘍

ヒト大腸正常上皮5例, 腺腫7例, 癌31例の核 DNA 量およびヒストグラムを表3, 図1に示す.

1) 大腸正常上皮

大腸正常上皮5例 (結腸3例, 直腸2例) の核 DNA 量は, 平均値 $2.47 \pm 0.144c$, 最頻値 $2.37 \pm 0.097c$, 分散幅 $2.09 \pm 0.183c$ と単一の高いピークを示した. over $3c$ は $11 \pm 3.2\%$ と少なく, over $4c$ はすべての症例において 0% であった.

2) 大腸腺腫

大腸腺腫7例の核 DNA 量は, 平均値 $2.77 \pm 0.099c$, 最頻値 $2.61 \pm 0.156c$, 分散幅 $3.50 \pm 0.953c$ と正常上皮よりもやや高い値を示し, over $3c$ $25 \pm 3.2\%$ で, over $4c$ は $2 \pm 0.5\%$ と $4c$ 以上の細胞の出現を認めた. 今回症例数が7例と少なく, 異型度と核 DNA 量との関連については比較できなかったが, これに関してはラットの項で詳細に検討を行った. また, いずれの項目も正常上皮と有意差を認めなかった.

3) 大腸癌

大腸癌31例 (結腸癌15例, 直腸癌16例) の核 DNA 量は, 平均値 $3.39 \pm 0.414c$, 最頻値 $3.12 \pm 0.611c$, 分

表3 大腸病変全体の細胞核 DNA 量

| | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| 正常上皮 | 5 | $2.47 \pm 0.144^{**}$ | $2.37 \pm 0.097^{**}$ | $2.09 \pm 0.183^{**}$ | $11 \pm 3.2^{**}$ | 0 ** |
| 腺腫 | 7 | $2.77 \pm 0.099^{**}$ | $2.61 \pm 0.156^*$ | $3.50 \pm 0.953^{**}$ | $25 \pm 3.2^{**}$ | $2 \pm 0.5^{**}$ |
| 癌 | 31 | 3.39 ± 0.414 | 3.12 ± 0.611 | 5.18 ± 1.385 | 59 ± 3.3 | 24 ± 2.9 |

* $p < 0.05$ vs. 癌

** $p < 0.01$

mean \pm S.D.

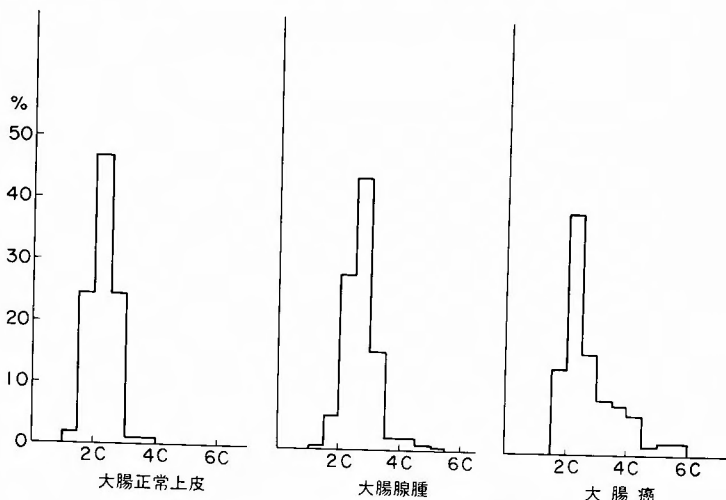


図1 ヒト大腸の細胞核 DNA ヒストグラム

散幅 $5.18 \pm 1.385c$ と高く, over 3c $59 \pm 3.3\%$, over 4c $24 \pm 2.9\%$ とこれらも高い値を示した. 大腸正常上皮や大腸腺腫と比較するとすべての項目において有意差(最頻値の腺腫と癌の間のみ $p < 0.05$, 他は $p < 0.01$)を認めた. さらに, 各項目ごとに癌について分布の95%点を取り, それを癌と非癌組織の境界値として検討したところ, 平均値 2.9c 以上, over 3c 36.0% 以上, over 4c 3.9% 以上を癌とみなすことができた. 最頻値と分散幅については, 癌と非癌組織を分離すること

はできなかった.

4) 大腸癌の予後規定因子と核 DNA 量の比較

a) 組織型ならびに分化度の比較

大腸癌31例のうち, 非粘液癌は27例で粘液癌は4例であった. また, 非粘液癌27例中高分化型6例, 中分化型17例, 低分化型4例であった. 各々の核 DNA 量について比較した(表4). 粘液癌は非粘液癌に比べてすべての項目において高値を示し, 平均値において有意差 ($p < 0.05$) を認めた. 非粘液癌については, 分化

表4 組織型の比較

| 組織型 | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|--------|----|--------------------|------------------|------------------|---------------|---------------|
| 高分化腺癌 | 6 | 3.21 ± 0.187 | 3.09 ± 0.375 | 4.54 ± 0.967 | 54 ± 13.8 | 15 ± 6.1 |
| 中分化腺癌 | 17 | 3.35 ± 0.443 | 3.05 ± 0.689 | 5.41 ± 1.585 | 59 ± 17.0 | 23 ± 16.9 |
| 低分化腺癌 | 4 | 3.43 ± 0.434 | 3.06 ± 0.611 | 4.35 ± 0.468 | 62 ± 26.0 | 26 ± 13.8 |
| 平均(腺癌) | 27 | $3.33 \pm 0.393^*$ | 3.06 ± 0.602 | 5.06 ± 1.399 | 56 ± 17.6 | 22 ± 14.8 |
| 粘液癌 | 4 | $3.80 \pm 0.360^*$ | 3.55 ± 0.559 | 6.01 ± 1.025 | 70 ± 10.2 | 35 ± 19.7 |

* $p < 0.05$

mean \pm S.D.

表5 深達度の比較

| 深達度 | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|-------|----|------------------|------------------|------------------|---------------|---------------|
| S (-) | 13 | 3.32 ± 0.515 | 3.06 ± 0.600 | 5.33 ± 1.665 | 55 ± 20.1 | 22 ± 19.6 |
| S (+) | 18 | 3.46 ± 0.331 | 3.17 ± 0.631 | 5.08 ± 1.183 | 63 ± 17.0 | 25 ± 12.8 |

mean \pm S.D.

S(-): ss または a_1 まで浸潤し s または a_2 以上に浸潤していないもの
 S(+): s または a_2 以上に浸潤しているもの

表6 リンパ節転移の比較

| リンパ節転移 | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|--------|----|------------|------------|------------|------------|------------|
| n (-) | 14 | 3.44±0.487 | 3.16±0.677 | 5.41±1.514 | 60±19.5 | 24±18.5 |
| n (+) | 17 | 3.35±0.356 | 3.10±0.570 | 4.99±1.284 | 58±18.1 | 24±13.8 |

mean±S.D.

表7 部位の比較

| 部位 | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|-------|----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 盲腸 | 4 | 3.42±0.461 | 3.05±0.643 | 5.33±1.137 | 63±23.9 | 24±12.1 |
| 上行結腸 | 4 | 3.60±0.162 | 3.30±0.211 | 5.51±0.843 | 77±10.9 | 25±6.6 |
| 横行結腸 | 4 | 3.60±0.162 | 3.30±0.211 | 5.51±0.843 | 77±10.9 | 25±6.6 |
| 下行結腸 | 7 | 3.51±0.582 | 3.30±1.002 | 4.91±1.724 | 59±20.3 | 31±24.4 |
| S字状結腸 | 7 | 3.51±0.582 | 3.30±1.002 | 4.91±1.724 | 59±20.3 | 31±24.4 |
| 結腸平均 | 15 | 3.49±0.448 | 3.23±0.736 | 5.18±1.333 | 65±19.7 | 27±17.5 |
| 直腸 | 16 | 3.29±0.364 | 3.02±0.467 | 5.18±1.476 | 55±16.3 | 20±13.7 |

mean±S.D.

度を比較したが、いずれの項目にも有意差を認めなかった。

b) 深達度の比較

S(-)群とS(+)群の核DNA量を比較すると、分散幅を除き、S(+)群はS(-)群よりやや高い値を示したが、有意差は認められなかった(表5)。

c) リンパ節転移の比較

n(-)群とn(+)群の核DNA量を比較すると、すべての項目においてn(-)群の方がn(+)群よりやや高い値を示したが、有意差は認められなかった(表6)。

d) 部位による比較

部位別に核DNA量を比較したが、各部位間に差は認められず、結腸と直腸を比較しても差は認められなかった(表7)。

e) リンパ管侵襲

ly(-)とly(+)の核DNA量を比較したが、差は認められなかった(表8)。

f) 静脈侵襲の比較

v(-)とv(+)の核DNA量を比較すると、v(+)はv(-)よりすべての項目において高い値を示し、最頻

表8 リンパ管侵襲の比較

| リンパ管侵襲 | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|--------|----|------------|------------|------------|------------|------------|
| ly (-) | 12 | 3.38±0.405 | 3.01±0.452 | 5.61±1.456 | 59±17.3 | 22±15.1 |
| ly (+) | 19 | 3.40±0.432 | 3.20±0.694 | 4.88±1.240 | 59±19.6 | 25±16.6 |

mean±S.D.

表9 静脈侵襲の比較

| 静脈侵襲 | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|-------|----|------------|-------------|------------|------------|------------|
| v (-) | 20 | 3.31±0.373 | 2.95±0.470* | 5.11±1.378 | 57±18.5 | 21±13.1 |
| v (+) | 11 | 3.54±0.464 | 3.42±0.746 | 5.31±1.453 | 60±20.2 | 28±19.9 |

* p<0.05

mean±S.D.

表10 Stage による比較

| stage | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|-------|----|------------|------------|------------|------------|------------|
| I | 2 | 3.04±0.325 | 2.87±0.276 | 4.49±0.453 | 42±27.8 | 9±1.9 |
| II | 10 | 3.49±0.515 | 3.11±0.749 | 5.73±1.691 | 61±17.2 | 26±20.1 |
| III | 6 | 3.48±0.403 | 3.18±0.605 | 5.16±0.842 | 67±22.8 | 26±9.8 |
| IV | 8 | 3.37±0.439 | 3.11±0.574 | 4.82±1.359 | 57±18.3 | 23±18.5 |
| V | 5 | 3.46±0.480 | 3.26±0.725 | 4.96±1.556 | 59±15.0 | 29±19.7 |

mean ± S.D.

値において有意差 (p<0.05) を認めた (表9).

g) stage

stage の核 DNA 量を比較したが各 stage 間に差は認められず, stage と核 DNA 量の間に関係は認められなかった (表10).

2. 実験 (ラット) 大腸腫瘍

1) 大腸腫瘍の病理組織判定基準

DMH 投与開始後25週目より, 適宜犠牲性剖検し大腸を摘出した. 肉眼的に判別しうるすべての隆起性病変ならびに対照群5例の平坦粘膜を採取し, 得られた標本に H. E. 染色を施して組織学的に検討した. 鏡検にあたり, 異型腺管巢を「大腸癌取扱い規約」⁹⁾に従って軽度, 中等度, 高度の3群に分類し, 高度異型腺管巢のうち粘膜下層以下へ浸潤を認めるもののみ癌とし, 正常上皮を含めて5群に分類した. 以下, 正常上皮, 軽度異型腺管巢, 中等度異型腺管巢, 高度異型腺管巢, 癌の順に, Group 1, 2, 3, 4, 5とした (図2, 3, 4, 5, 6). この基準に従い病変を分類すると, Group 1 5例, Group 2 7例, Group 3 5例, Group 4 5例, Group 5 7例の計29例となった. Group 5 7例はすべて高分化型腺癌であった.

2) 大腸腫瘍の発生について

対照群の大腸粘膜は, リンパ濾胞の部位を除き隆起性病変を認めず, 採取された平坦粘膜の組織学的検索においても異型腺管巢は認められなかった. 対照群を

表12 腫瘍発生部位

| 肛門縁からの距離 (cm) | Group 2 (n=7) | Group 3 (n=5) | Group 4 (n=5) | Group 5 (n=7) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0~5 | 4 | 2 | | |
| 5~10 | 1 | | 1 | |
| 10~15 | | 1 | 1 | 1 |
| 15~20 | 1 | 2 | 1 | 5 |
| 20~ | 1 | | 2 | 1 |

除く24病変について, 発癌剤投与開始から屠殺までの期間, 腫瘍発生部位, 粘膜最大径を表11, 表12, 表13に示す. 発癌剤投与後25週目にはすでに腫瘍の発生を認め, 32週目には癌の発生を認めた. 腫瘍発生数は1つの大腸標本中におよそ2~3ヶで, 腫瘍発生部位は全大腸に及ぶものの, Group 4 や Group 5 は近位結腸に多く発生した. 腫瘍最大径は 4 mm~8 mm が多く, Group 5 になると 10 mm 以上のものも認めた.

3) 大腸腫瘍の核 DNA 量

Group 1 5例, Group 2 7例, Group 3 5例, Group 4 5例, Group 5 7例の核 DNA 量およびヒストグラムを表14, 図7に示す.

a) Group 1

Group 1 5例の核 DNA 量は, 平均値 2.40±0.202c, 最頻値 2.41±0.197c, 分散幅 1.65±0.373c と単一の高いピークを示した. over 3c は 6±6.2% と低く,

表11 DMH 投与開始より屠殺までの期間

| 週 | Group 2 (n=7) | Group 3 (n=5) | Group 4 (n=5) | Group 5 (n=7) |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ~30 | 1 | 1 | 1 | |
| 31~35 | 2 | | 2 | 4 |
| 36~40 | 4 | 1 | | 2 |
| 41~45 | | 2 | 1 | |
| 46~ | | | | 1 |

表13 粘膜面最大径と組織像

| 大きさ (mm) | Group 2 (n=7) | Group 3 (n=5) | Group 4 (n=5) | Group 5 (n=7) |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ~3.9 | | | 1 | |
| 4.0~5.9 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 6.0~7.9 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 8.0~9.9 | 1 | 2 | 1 | |
| 10.0~ | | | | 3 |

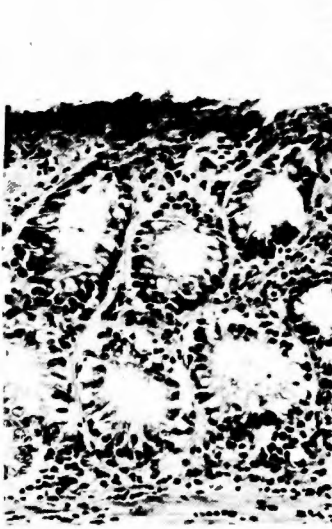


図2 Group 1 H. E. 染色 ×100倍

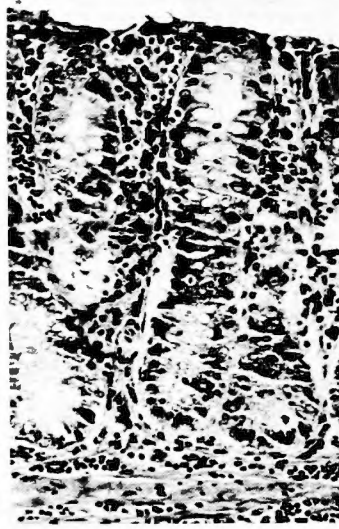


図3 Group 2 H. E. 染色 ×100倍



図4 Group 3 H. E. 染色 ×100倍

over 4c はすべて0%であった。

b) Group 2

Group 2 7例の核 DNA 量は, Group 1 に比べて各項目とも高い値を示しており, 平均値, 分散幅, over 3c において有意差 ($p < 0.01$) を認めた。また, over 4c も $1 \pm 0.6\%$ とわずかに認めた。

c) Group 3

Group 3 5例の核 DNA 量は, 各項目とも Group 1 と比べて高い値を示しており, 平均値, 分散幅, over 3c に有意差 ($p < 0.01$) を認めた。Group 2 と比較するとやや高い値を示したものの, 各項目とも有意差を認め

なかった。

d) Group 4

Group 4 5例の核 DNA 量は, Group 1 に比べてすべての項目において有意差 ($p < 0.01$) を認め, Group 2 と比較すると, 平均値, 最頻値, over 3c, over 4c に有意差 ($p < 0.01$) を認め, Group 3 と比較すると, 平均値, 最頻値, over 3c に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。また, over 4c が5%以上のものを1例認めた。

e) Group 5

Group 5 7例の核 DNA 量は, Group 1, Group 2 および Group 3 と比較するとすべての項目において有意



図5 Group 4 H. E. 染色 ×100倍



図6 Group 5 H. E. 染色 ×100倍

表14 ラットの大腸腫瘍全体の細胞核 DNA 量

| Group | 例数 | 平均値 (c) | 最頻値 (c) | 分散幅 (c) | over 3c(%) | over 4c(%) |
|-------|----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 5 | 2.40±0.202 | 2.41±0.197 | 1.65±0.373 | 6±6.2 | 0±1.6 |
| 2 | 7 | 2.72±0.124 | 2.57±0.153 | 2.33±0.171 | 23±10.4 | 1±0.6 |
| 3 | 5 | 2.74±0.090 | 2.59±0.105 | 2.33±0.555 | 24±8.1 | 2±1.5 |
| 4 | 5 | 2.92±0.093 | 2.83±0.161 | 2.47±0.358 | 40±8.8 | 3±1.6 |
| 5 | 7 | 3.01±0.084 | 2.88±0.126 | 3.48±0.394 | 45±6.9 | 5±2.7 |

mean ± S.D.

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| 2 ** | 2 (-) | 2 ** | 2 ** | 2 (-) |
| 3 **(-) | 3 (-)(-) | 3 **(-) | 3 **(-) | 3 (-)(-) |
| 4 **** * | 4 **** * | 4 **(-)(-) | 4 **** * | 4 **** (-) |
| 5 *****(-) | 5 *****(-) | 5 *****(-) | 5 *****(-) | 5 **** * |
| 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 |

*: p<0.05 **: p<0.01 (-): NS

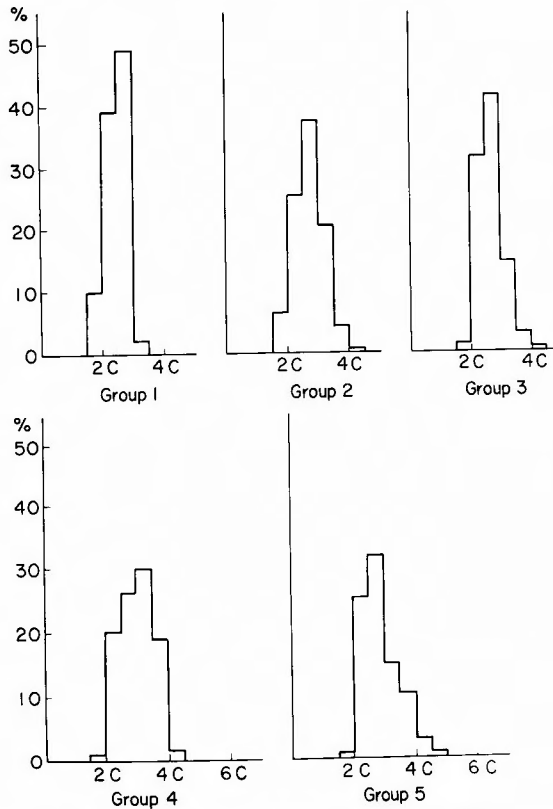


図7 ラット大腸の細胞核 DNA ヒストグラム

差 ($p < 0.01$) を認めた. Group 4 と比較すると over 4c にのみ有意差 ($p < 0.05$) を認めた. また, over 4c が 5% 以下のものを 4 例認めた. 全体に異型度が進むにつれて, 核 DNA 量の増加傾向を認めた.

IV 考 察

腫瘍の病理組織像と核 DNA 量に関する研究は, Leuchtenberger¹⁸⁾, Atkin ら¹⁹⁾によって始められ, 大腸癌やポリープに関する研究は, Stich ら²⁰⁾の報告に始まり, わが国においても進藤²¹⁾, 花輪⁷⁾, 木村¹⁷⁾らが行っている. いずれの研究者も悪性腫瘍の病理組織像と核 DNA 量との間にはかなりの相関があると報告し, 実験大腸癌についても同様に相関があるとしている.

腫瘍の核 DNA 量の測定には, 測定対象部位を正確に採取し細胞分離操作を行うことが必要である. ヒトの大腸癌のように大きいものであれば細胞採取は容易であるが, ラット大腸腫瘍のような微小病変部位を正確に採取することはなかなか困難である. このため木村¹⁷⁾や川村ら¹⁶⁾は細胞分離を行わず, 薄切切片に染色を行い, そのまま測定している. この方法によると, 測定部位が正確になり, 各層ごとの測定も可能で, 腸管上皮の cell turnover などの細かい検索ができる利点がある. 一方で細胞の重なりや変形が多く, 各標本ごとに測定対象内の細胞数にばらつきが生じ, ことに微小病変では測定可能な細胞数が異常に少ないなど, 結果的に誤った測定値を示す恐れがある. 今回著者は, H. E. 染色で病変部位を確認した後, ヘマトキシリン染色を施した 30 μ 切片を40倍で鏡検しながら対象部位を正確に採取し, 細胞分離操作を行った.

ヒト大腸腫瘍の核 DNA 量を測定し, 平均値, 最頻値, 分散幅, over 3c, over 4c の 5 項目について検討したが, いずれの項目においても, 正常上皮, 腺腫, 癌の順に高い値を示した. また, 正常上皮と腺腫の間にはいずれの項目も有意差を認めなかったが, 癌は非癌組織に比べてすべての項目において有意に高値を示した. これらの結果は, 諸家^{7, 17, 25)}の報告と一致した. さらに著者は今回の実験結果より, 良悪性境界について検討してみた. 癌について分布の95%点を取り, それを癌と非癌組織の境界値として 5 項目につきそれぞれ検討したところ, 平均値 2.9c 以上, over 3c 36.0% 以上, over 4c 3.9% 以上を癌とみなすことができた. 最頻値と分散幅については癌と非癌組織を分離することはできなかった.

胃癌や大腸癌の良悪性境界について, 岩佐¹²⁾は典型

的な胃癌の核 DNA 量の場合, 分散幅の拡大, 最頻値の扁平化, 多峰化が特徴であるとし, さらに良悪性の最も大きな鑑別点は 4c 以上の細胞核の占める割合で, これが 5.0% 以上の場合を癌の診断基準とした. 今津¹⁰⁾は胃癌の悪性診断として, 1) ploidy の変化, 2) 多峰性, 3) 扁平化, 4) 分散幅の拡大, 5) over 4c 以上の核 DNA 量をもつ細胞の出現または増加をあげ, 花輪⁷⁾は大腸癌では平均値 2.99c 以上, 最頻値 2.80c 以上, 変異係数 34.8% 以上, over 4c 5% 以上, 中央値 2.84c 以上の諸条件をすべて満す病変は大腸癌と推定できると報告している. いずれの報告でも, 良悪性の鑑別診断を 4c 以上の細胞核の占める割合が 5% 以上であるかどうかを 1 つの基準としている. 今回のヒト大腸癌の実験結果でも, 癌はすべて 5% 以上であり, 非癌組織は 5% 以下であった. しかしながら, この核 DNA 量の判定はあくまで量的なもので, 質的なものではない. 広瀬⁹⁾のいうように, 同じ 4c の細胞核でも良性の 4c あるいは hyper 4c は分裂期直前のものをとらえており, 細胞分裂がきわめて多い時 4c 以上の核がみられるとし, 癌組織における 4c 以上の核は分裂直前のもの他, 異常分裂, ことに染色体の不均等分離あるいは染色体の不分離などによって生じた核 DNA 量の多い核をとらえている可能性が高いとしている.

大腸癌の核 DNA 量と予後を左右する因子に関する報告は少なく, 諸家によって意見が異なっている. 花輪⁷⁾は組織型, 分化度, 異型度, 深達度などに差を認めたと報告し, 松嶋ら¹⁹⁾はリンパ節転移, リンパ管侵襲, Dukes 分類に有意差を認め, 辻田ら³²⁾はリンパ管侵襲には差はなく, 静脈侵襲に差を認めたと報告している. 著者はヒト大腸癌 31 例について, 組織型, 分化度, 深達度, リンパ節転移, 部位, リンパ管侵襲, 静脈侵襲, stage の 8 項目について検討した. 組織型の平均値と静脈侵襲の最頻値にのみ有意差を認めたが, 他は有意差を認めなかった. 組織型のうち粘液癌は非粘液癌よりすべての項目において高値を示し, 平均値に有意差を認めたが, これは花輪⁷⁾の結果とは逆になった. 粘液癌の中にも分化度によって多少核 DNA 量は異なると考えられ, また, 今回症例数が 4 例と少なかったため, 今後症例数を重ねる必要がある. 静脈侵襲はすべての項目において v(+) の方が高値を示し, 最頻値に有意差を認めた. これは辻田ら³²⁾の報告とはほぼ一致した. 諸家^{7, 19, 32)}の報告においても, リンパ節転移, リンパ管侵襲, 静脈侵襲は予後規定因子の

中でも重要な項目の1つにあげられており、今回の実験結果から核 DNA 量の高い癌は静脈侵襲がおりやすいのではないかと推測された。

実験大腸癌の発生に関しては、1967年に Druckreyら⁶⁾が初めて報告して以来、DMH (N-N'-dimethylhydrazine dihydrochloride) または MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) などの発癌剤を投与することにより容易に、かつ簡単にラット大腸に癌を発生させることができるようになった。この大腸癌あるいは腺腫の発生、進展様式がヒトと同一かどうかは充分解明されていないもの、組織学的にヒト大腸腫瘍と類似性が多いことから、ヒト大腸癌の発生機構や組織学的研究に広く利用されている。今回ウィスター系ラット雄に DMH を皮下投与することにより、大腸に隆起性病変の発生を認め、これらすべてに病理学的検索を加えた。異型腺管巢を「大腸癌取扱規約」⁹⁾に従い Group 2 (軽度)、Group 3 (中等度)、Group 4 (高度) の3群に分類し、Group 4 の中で粘膜下層以下へ浸潤したもののみ Group 5 (癌) とし、Group 1 (正常上皮) を含めて大腸病変を計5群に分類した。Group 4、Group 5 は近位結腸に多く発生し、上谷ら¹⁴⁾の DMH 誘発ウィスター系ラット大腸癌の結果と一致した。すべての病変について各々の核 DNA 量を測定し、ヒトと同様に平均値、最頻値、分散幅、over 3c、over 4c を求め、各項目ごとに組織型との関連について比較・検討を行った。結果は異型度が進むにつれ核 DNA 量の増加傾向を認め、木村¹⁷⁾や川村ら¹⁸⁾の報告と同様の結果を得た。また、Group 4 と Group 5 の核 DNA 量を比較すると、over 4c を除き有意差を認めなかった。over 4c に関して、Group 5 の中に5%以下のものを4例認め、Group 4 の中に1例5%以上のものを認めた。Group 4 の1例については、ヒト大腸癌の判定基準の1つである over 4c が5%以上であることを採用すれば、粘膜内癌あるいは癌とみなしてよいと考えられる。一方、Group 5 の中で over 4c が5%以下であったものが4例あったことは、このラット実験大腸癌に関する限り、over 4c が5%以上であることが癌の判定基準にはなり得ないことを示している。

さらに、ラット大腸癌をヒト大腸癌と比較すると、ラット大腸癌の方が低い値を示し、核 DNA ヒストグラムも比較的狭いものとなった。これは1つには、ラット大腸癌はヒト大腸癌に比べて発癌因子も単一であり、発癌剤投与から屠殺までの期間も短かかったためか、リンパ節転移や肝転移は見られず、組織学的に

もすべて高分化型腺癌で、深達度も筋層まで浸潤したものは少なく、粘膜下層に浸潤していなければ癌と判定しにくいほどよく分化した像を呈していたことと関連があると思われる。成沢²²⁾や宮野ら²⁰⁾は、ラット大腸癌は癌の生物学的特性が少なく、病理組織学的にも悪性度が低かったと報告しており、著者の結果と同様で、これらの所見と核 DNA 量とはよく相関していたと考えられる。

大腸癌の組織発生については古くから諸説があり、Jackman¹³⁾ あるいは Morson ら²¹⁾は腺腫を母地として癌が発生する adenoma-cancer sequence を主張し、Spratt²⁷⁾、Castleman⁴⁾、Bockus ら²⁾は de novocarcinoma (腺腫を経過せず正常粘膜から直接癌が発生する) を主張し、いまだに結論は出ていない。今日では、腺腫の一部に癌が発生し、これが徐々に増大していくという考えが一般に認められており、大腸検査の際にもポリープを発見すれば、すべて摘出することが原則となっている²⁶⁾。一方、石沢¹¹⁾や狩谷ら¹⁵⁾の IIc 様大腸早期癌の発見により、de novo にも発生する可能性も示唆されている。今回のラットの実験結果から、異型度が進むにつれて核 DNA 量の増加傾向を認めたこと、核 DNA 量の結果で Group 4 の中に粘膜内癌または癌と思われるものを認めたこと、Group 5 の周囲に異型腺管巢が存在したことなどから著者は、腺腫や異型腺管巢から徐々に癌が発生するのではないかと推察した。しかし、上谷ら¹⁴⁾は DMH 誘発大腸癌の検討により、印環細胞癌は腺腫とは関係なく、腺管の底部より de novo に発生すると述べており、宮野²⁰⁾も粘膜内に限局した印環細胞癌の周辺粘膜に異型腺管巢を認めなかったことから、少なくとも一部の印環細胞癌は、de novo 発生すると推察しているように、決して de novo 発生も否定できないのである。

今回の研究により、ヒト大腸癌に関しては著者もある程度の境界値を見出すことができ、over 4c が5%以上を癌の判定基準にしてもよいと考えられた。しかし、ラット大腸癌の結果を参考にすれば、over 4c が5%以上ということは必ずしも癌判定基準にはなり得ず、やはり境界病変といわざるを得ないものを認めた。ただ、ヒトにおいて、腺腫の中で over 4c が5%以上のものは前癌状態あるいは癌として取り扱ってよいのではないかと思われた。

V ま と め

ヒト大腸正常上皮5例、腺腫7例、癌31例を対象と

して核 DNA 量を測定し、組織像との関連について比較・検討した。また、ラット大腸正常上皮5例、DMH誘発ラット大腸腫瘍24例についても同様の検討を行い、以下のような知見を得た。

1) ヒト大腸正常上皮、腺腫、癌の順に核 DNA 量が高い値を示した。正常上皮と腺腫の間に有意差を認めなかったが、腺腫と癌の間に有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

2) ヒト大腸腫瘍の良悪性境界について検討を行ったところ、平均値 2.9c 以上、over 3c 36.0% 以上、over 4c 3.9% 以上を癌とみなすことができた。また、over 4c が5%以上は今回の結果では、癌の診断基準となり得た。

3) ヒト大腸癌31例について、組織型、分化度、深達度、リンパ節転移、部位、リンパ管侵襲、静脈侵襲、stage の8項目について検討を行ったところ、組織型の平均値と、静脈侵襲の最頻値にのみ有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

4) ラット大腸腫瘍について、異型度が進むにつれて核 DNA 量の増加傾向を認めた。

5) Group 4 の中に over 4c が5%以上のものを1例認め、また、Group 5 の中に over 4c が5%以下のものを4例認めたことにより、over 4c が5%以上は癌の診断基準とはなり得なかった。

6) 以上の結果より、大腸癌は腺腫より徐々に発生するのではないかと推察され、一方、ヒト腺腫の中で over 4c が5%以上のものは前癌状態あるいは癌として取り扱ってよいと考えた。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲下さいました石上浩一教授に深く感謝の意を表するとともに、第2外科医局員の皆様に感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第43回日本消化器病学会中国地方会 (昭和60年6月、於広島) および第23回日本癌治療学会総会 (昭和60年11月、於広島) において発表した。

文 献

- Atkin NB and Richards BM: Deoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: A comparison of tumours arising at different sites. *Br J Cancer* **10**: 769-786, 1956.
- Bockus HL, Tachdjian V, et al: Adenomatous polyp of colon and rectum; its relation to carcinoma. *Gastroenterol* **41**: 225-232, 1961.
- Brachet J: Comments on the biochemical interactions between the nucleus and the cytoplasm. *Biochemistry*, New York, **22**: 213-220, 1957.
- Castleman B and Krickstein HI: Do adenomatous polyps of the colon become malignant? *N Eng J Med* **267**: 469-475, 1962.
- 大腸癌研究会編: 大腸癌取り扱い規約 (第3版). 金原出版, 1983.
- Druckrey H, Preussmann R, et al: Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch 1,2-Dimethyl-hydrazin. *Naturwissenschaften* **54**: 285-286, 1967.
- 花輪 聡: 大腸癌の細胞核DNA量に関する研究. *大腸肛門誌* **31**: 450-467, 1978.
- 広瀬俊太, 岩佐善二: DNA 解析一消化管の境界病変の核 DNA 量についての検討. *癌の臨床* **18**: 859-869, 1972.
- Hotchkiss RD: The biological role of the deoxypentose nucleic acids. *The Nucleic Acid* **2**: 435-473, 1955.
- 今津和也: 核 DNA 量による胃良性悪性疾患の診断基準について一特に細胞診自動化への可能性に関する基礎的臨床的研究一. *神戸大学医学部紀要* **38**: 73-92, 1978.
- 石沢 隆, 西 満正, 他: 大腸多発ポリープに認められた Iic 様大腸早期癌2病変. *胃と腸* **14**: 529-536, 1979.
- 岩佐善二: 固定組織からの細胞分離法を応用した一新核 DNA 量顕微分光測光法ならびにその胃癌への応用について. *阪大医誌* **23**: 243-264, 1971.
- Jackman RJ, Mayo CW, et al: The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gyn Obst* **193**: 327-330, 1951.
- 上谷潤二郎, 武藤徹一郎: 1,2-Dimethylhydrazine によるウイスター系ラット実験大腸癌の検討一特に好発部位の癌の組織発生について一. *日消病会誌* **75**: 1934-1946, 1978.
- 狩谷 淳, 水野幸一, 他: Iic 型早期大腸癌が認められた家族性大腸ポリポージスの1例. *胃と腸* **12**: 1359-1364, 1977.
- 川村慶三: DMH 投与によるラット大腸癌とその周辺および背景粘膜の病態に関する研究. *大腸肛門誌* **37**: 714-724, 1984.
- 木村 修: 核DNA量測定による DMH 誘発ラット実験大腸癌の組織発生に関する研究. *米子医誌* **33**: 201-213, 1982.
- Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, et al: A microspectrophotometric study of the deoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues. *Am J Pathol* **30**: 65-85, 1954.
- 松嶋一晃, 松本好市, 他: 大腸癌の進展度と癌細胞核 DNA 量に関する臨床病理学的研究. *日消外会誌* **18**: 1292, 1985.
- 宮野陽介: DMH 誘発ラット大腸癌の組織発生に関する研究. *日外会誌* **82**: 1280-1290, 1981.
- Morson BC: Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg* **55**: 725-

731. 1968.
- 22) 成沢富雄：実験大腸癌研究の概況。医学のあゆみ **103**: 203-208, 1977.
- 23) 日本組織細胞化学会編：組織細胞化学1982. 学際企画：229-247, 1982.
- 24) Ogawa K, Himes M, et al: Changes in Deoxyribonucleic acid content of experimental tumors in C3H mice. *Cancer Res* **19**: 596-601, 1959.
- 25) 進藤勝久：大腸上皮における核 DNA 量解析と発癌過程研究への応用。阪大医誌 **26**: 313-329, 1974.
- 26) 白鳥常男, 藤井久男, 他：結腸癌。消化器外科 **7**: 832-836, 1984.
- 27) Spratt JS, Ackerman LV, et al: Relationship of polyps of the colon to colonic cancer. *Ann Surg* **148**: 682-698, 1958.
- 28) Stich HF, Florian SF, et al: The DNA content of tumor cells. I. Polyps and adenocarcinomas of the large intestine of man. *J Natl Cancer Inst* **24**: 471-482, 1960.
- 29) Swift H: The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **36**: 643-654, 1950.
- 30) 友永 進, 寺中正樹, 他：顕微分光測光法による Feulgen-DNA 定量値の算出法に関する一考察。山口医学 **19**: 9-17, 1970.
- 31) 友永 進, 寺中正樹, 他：Feulgen 加水分解法の検討。山口医学 **19**: 19-26, 1970.
- 32) 辻田和紀, 鳥越義房, 他：大腸癌核 DNA 量と臨床病理学的所見との関連について。日消外会誌 **19**: 1293, 1985.
- 33) 吉田俊秀：癌の発生, 増殖と染色体。日本臨床 **19**: 2273-2284, 1961.