

ヒトおよび実験食道癌の核 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)

本 間 喜 一

〔原稿受付: 昭和59年6月30日〕

A Microphotometric Study on the Nuclear DNA Contents in Cells of Human and Experimental Esophageal Cancers

KIICHI HONMA

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

The nuclear DNA content was measured in cells from resected specimens of 47 patients with esophageal cancer and compared with other prognostic factors, to investigate whether the nuclear DNA content in cancer cells reflects the degree of clinical malignancy. The relation between the nuclear DNA content and the sensitivity of esophageal cancer to Bleomycin was also analyzed.

The following results were obtained.

The group of less than 50% incidence of over 4c cells had significantly, (1) higher incidence of the protruded and superficial types according to the types of the macroscopical findings ($p < 0.01$), (2) higher incidence of no lymphatic permeation ($p < 0.05$), (3) higher incidence of no lymphnode metastases ($p < 0.05$), and (4) better 2-year-survival rate ($p < 0.05$), than the group of more than 50% incidence.

As compared with the cases that had low sensitivity rates to Bleomycin, the cases that had high sensitivity rates to Bleomycin showed significantly, (5) higher incidence of the protruded and superficial types ($p < 0.05$), (6) higher incidence of the well differentiated type according to the types of histological findings ($p < 0.1$), and (7) higher incidence of no lymphnode metastases ($p < 0.05$).

From these results, the nuclear DNA content was useful as one of prognostic factors. And aggressive therapy seems to have a good effect on the cases that have the protruded or superficial type and no lymphnode metastases because these cases showed the low malignancy grading in view of the nuclear DNA contents and the high sensitivity rates to Bleomycin.

Key words: Esophageal cancer, Experimental esophageal cancer, Nuclear DNA content, DNA histogram pattern, Sensitivity to Bleomycin.

索引語: 食道癌, 実験食道癌, 核 DNA 量, DNA ヒストグラムパターン, プレオマイシン感受性.

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

Furthermore, N-methyl-N-amyl nitrosamine was given to male Donryu rats, and esophageal papilloma and cancer were made. The nuclear DNA contents of the papilloma and cancer were measured and analyzed in each 20 rats, respectively.

The following results were obtained.

Comparing the esophageal cancers with the human esophageal cancers, the Type III in the DNA histogram patterns was recognized in the human cancers, but not in the experimental cancers. And there were differences between them according to the mode values and width of distribution of the nuclear DNA content.

The incidence of over 4c cells exceeded 5% in all rats with papilloma and some rats of them showed the same DNA histogram patterns as the rats with experimental cancer.

From these results, the author concluded that there were some differences between experimental and human esophageal cancers, and papilloma may be a precancerous lesion.

I 結 言

食道癌手術の予後は、麻酔管理、栄養管理、手術手技および放射線療法、化学療法、免疫療法などの合併療法の進歩にもかかわらず、他の消化器系の悪性腫瘍と比較して良好とはいえない^{11,20,29}。その原因については、進行例の多いこと、高齢者の多いこと、および手術手技上の困難性など多くのことがあげられている^{13,14}。

近年組織化学の進歩により、従来組織学的レベルではとらえられなかった知見が多く得られるようになるとともに、定量的に測定できるようになった。Caspersson⁹ によりはじめられた顕微分光測光法は、多くの研究者により装置、測定方法などに改良が加えられ^{21,23}、個々の細胞の核 DNA 量を正確に測定できるようになった。核酸は細胞の増殖、蛋白合成の中核的存在であり、なかでも DNA は染色体に局在し、遺伝子を担っている。したがって、DNA は悪性腫瘍の本態を解明する上で重要な物質であると考えられる。また細胞の核 DNA 量は同一種の動物であれば一定であり^{21,19}、悪性腫瘍では増加するということが広く認められている^{21,16,17}。

著者は、細胞の中核の構成物質の一つである核 DNA が臨床的にどのような意味を持つのかを知るために、食道癌で、核 DNA の間接的な観察方法である核 DNA 量を測定し、他の予後規定因子と比較・検討した。さらに DNA が、癌細胞の性格を規定するものであるとすれば、癌細胞の制癌剤に対する感受性にも影響を及ぼすであろうと考えて、両者を比較・

検討した。

またラットにN-メチル-N-アミルニトロサミン(以下 MAN) を投与し、乳頭腫および実験食道癌を作成した。実験食道癌の核 DNA 量を測定し、ヒト食道癌と比較・検討するとともに、乳頭腫においては組織学的レベルではとらえられない変化を、核 DNA 量を測定することによって追求した。

II 対象および方法

1. 対象

a) ヒト食道癌

昭和56年4月から昭和57年2月までの1年11ヶ月の間に山口大学第2外科で切除された食道癌のなかで、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47例を対象として、核 DNA 量およびプレオマイシンに対する感受性を測定した。対象とした47例は全例進行癌で扁平上皮癌であった。さらに対照として、2例の正常食道上皮の核 DNA 量も測定した。

b) 実験食道癌および乳頭腫

100g 前後の呑竜ラットに水道水で0.003%に希釈した MAN 溶液(岩井化学薬品株式会社)を12週間、飲料水として自由に摂取させ、以後は水道水のみを投与した。またラットは MF 固型飼料(オリエンタル酵母株式会社)にて飼育した。16週から32週の間には犠牲剖検し、乳頭腫および食道癌が発生していた40頭を対象として、その核 DNA 量を測定した。

2. 方法

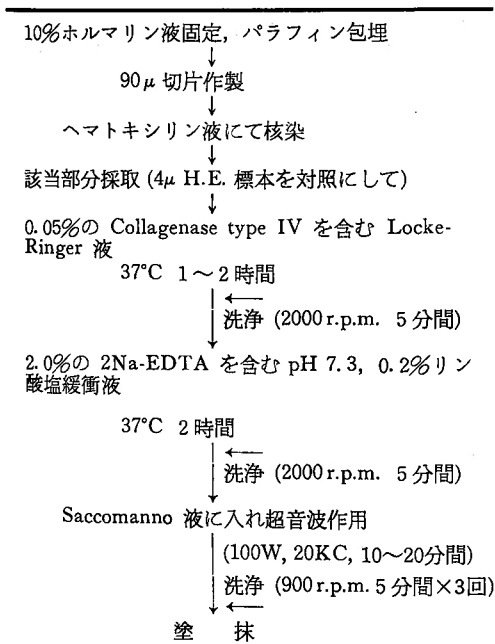
a) 核 DNA 量の測定

(1) 標本作成法および染色法

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ブロックを使用した。病変部で4 μ と90 μ の2種類の切片を交互に作成した。4 μ の切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、病変部の検索、確認に用いた。90 μ の切片は芦原ら²²⁾の方法にて細胞分離操作を行った(表1)。まず90 μ の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た。つぎに4 μ のH. E. 標本を顕微鏡下で観察しつつ、90 μ 切片よりリンパ球も充分含まれるように測定対象部位を肉眼的に採取した。ラットの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のち、同一ラットの正常リンパ節の90 μ 切片を作成し、採取し、測定対象部位に混じて細胞分離操作を行った。

90 μ 切片より採取した組織片を、0.05%コラゲナーゼ(Type IV, Sigma)を含むLocke-Ringer液で、37°C、2~4時間攪拌しながらインキュベートしたのち、2% EDTA-2Naを含む0.2%リン酸塩緩衝液(pH 7.3, 20°C)で37°C、2時間インキュベートした。そして遠沈(2000 r.p.m., 5分間)し、沈渣にSaccomanno液を加えて、超音波(100 w, 20 Kc)を10~20分間作用させた。超音波作用後、2分間静置し、上層の混濁液のみを小試験管に移し、遠沈(2000 r.p.m., 5分間)し、

表1. 細胞分離の操作



上清を捨て、沈渣に生理食塩水を加えて攪拌し、遠沈(1000 r.p.m., 5分間)を3回繰り返して洗浄を行った。最後に得た沈渣を、薄く卵白グリセリンを塗ったスライドガラス上に塗抹し、2日間自然乾燥させた。

Feulgen染色は友永ら^{32,33)}の方法に準じて以下のように行った(表2)。まず5N HCL, 25°Cで50分間加水分解を行ったのち、蒸留水でよく洗浄した。つぎにSchiff試薬(半井化学)に室温で60分間浸して染色したのち、亜硫酸溶液で各回2分間ずつ3回洗い、さらに蒸留水で充分洗ったのち、脱水・透徹・封入を行った。

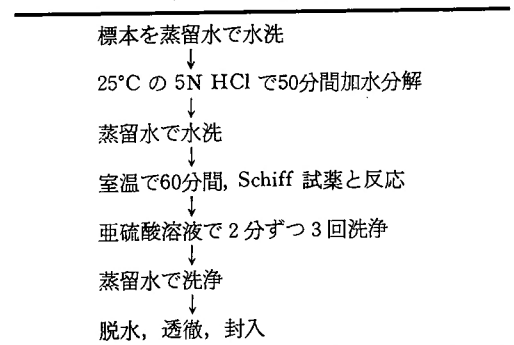
(2) 核 DNA 量の測定法

現在核 DNA 量の測定には顕微分光測光法が行われているが、これには吸光測光法と螢光測光法があり、吸光測光法は固定光束による方法と走査測光法に大別できる³⁰⁾。著者は細胞分離を行った標本を使用したのち、最も適していると思われる走査測光法で測定を行った。測定装置はNikon-Vickers M85顕微濃度計を使用した。吸光測光に用いた単色光の波長は560 nm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、光路を測光系へ変更して、核 DNA 積分量を測定した。一標本につき癌および乳頭腫細胞を200個、リンパ球を50個測定した。50個のリンパ球の核 DNA 量の平均値を算出し、diploid (2c)として対照とした。そして1/2c間隔で癌および乳頭腫の核 DNA 量のヒストグラムをマイクロコンピューターを使用して作成した。

(3) DNA ヒストグラムパターンの作成

現在までDNAヒストグラムの評価の方法に関しては、さまざまなことがいわれている。以前は単にmode valueやmean valueで評価されていたが、近年はさらに分布の幅も考慮して評価されるようになって

表2. Feulgen染色



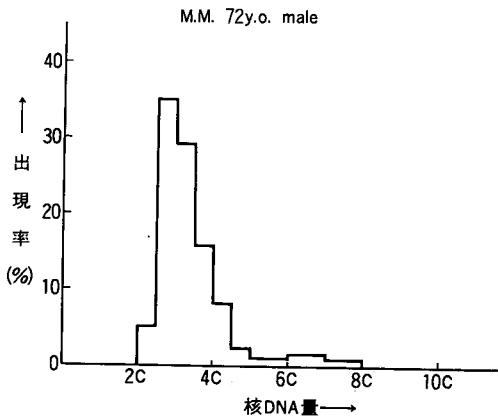


図1. DNA ヒストグラムパターン I 型

てきた。著者は、悪性病変と非悪性病変の核 DNA ヒストグラムの違いは 4c 以上の細胞の出現する比率の差にあるという報告^{10,12)}に着目し、4c 以上の細胞の出現比率によって悪性度がとらえられるのではないかと考えた。さらに分布の幅をみるために 6c 以上の細胞の出現比率も考慮して、DNA ヒストグラムを以下のように3つのパターンに分類した。また代表的な例を図1, 2, 3に示した。

I 型: 4c 以上の細胞が全体の50%未満のもの (図1)

II 型: 4c 以上の細胞が全体の50%を超えるが、6c 以上の細胞が30%未満のもの (図2)

III 型: 6c 以上の細胞が全体の30%を超えるもの (図3)

b) プレオマイシン感受性試験

ヒト食道癌47例について、化学療法剤として現在最

表3. 制癌剤感受性試験 (INAS 法)

摘出標本	
↓ Stadié-Riggs の Slicer で	
↓ 500 μ の厚さにスライス	
組織スライス 200 mg	
20%非働化 牛血清添加 TC199 1.8 ml	
制癌剤	0.5 ml
↓ 37.5°C で4時間 incubation	
0.5 ml の labeled precursor (³ H-thymidine) を添加	
↓ 37.5°C で1時間 incubation	
DNA 抽出	
比放射活性算出	

も多く使用されているプレオマイシンに対する感受性試験を INAS (Inhibition of Nucleic Acid Synthesis) 法で施行した。INAS 法は東ら^{8,9)}によって考案された、核酸合成阻害を指標とする制癌剤感受性試験であり、以下の方法によって行った (表3)。

新鮮な手術標本から比較的均質で壊死巣のない腫瘍部を採取し、Stadié-Riggs の slicer で 500 μ の厚さにした。スライスされた組織 200mg ずつをワールブルグのフラスコにいれ、それぞれ25, 5, 1および 0.2 μ g/ml 濃度のプレオマイシンを加えて20%非働化仔牛血清添加 TC199 中で4時間 preincubation した。つづいて、labeled precursor として 0.5 ml ³H-thymidine をそれぞれに加えて、37.5°C, 1時間 incubation した。incubation 後、腫瘍組織を採り出し Schmidt-Thannhauser 法によって DNA を抽出した。そしてその放射活性を液体シンチレーションカウンター (packard 3385) に

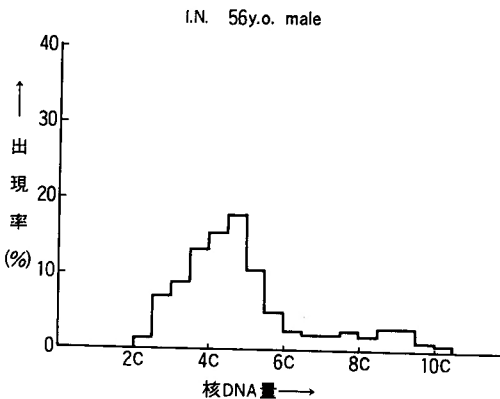


図2. DNA ヒストグラムパターン II 型

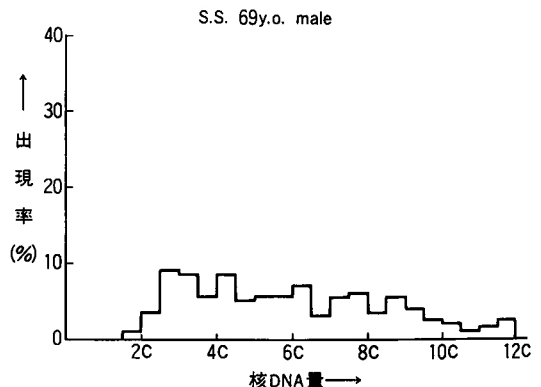


図3. DNA ヒストグラムパターン III 型

て測定した。また DNA を diphenylamine 法で定量し、比放射活性を下記のように算出した。

$$\text{Percent radioactivity} = \frac{\text{Radioactivity of DNA (cpm/ml)}}{\text{Quantity of DNA } (\mu\text{g/ml})} \times \text{cpm}/\mu\text{g DNA}$$

各濃度についてそれぞれプレオマイシンを加えない対照をつくり、同様な操作を行った。そしてその対照と比較して、腫瘍の DNA 合成が70%以下に抑制されたものを感受性陽性、それ以外のものを感受性陰性とした。この判定規準は東らと同様にした^{8,9)}。

III 結 果

1. ヒト食道癌

a) 正常食道上皮の核 DNA 量 (図4)

症例1および2の mode value はそれぞれ 2.21c, 2.29c で, mean value は 2.24c, 2.47c であった。両症例ともに、単一の高いピークを示し、分布の幅も狭く、3c を越える細胞は少なく、4c を越える細胞は認められなかった。図1, 2, 3 で示した DNA ヒストグラムとは明らかな違いを認めた。

b) 食道癌の DNA ヒストグラムパターンとプレオマイシン感受性 (表4)

DNA ヒストグラムパターン I 型は22例(46.8%), II 型は16例(34.0%), III 型は9例(19.2%)であり, 4c 以上の細胞の占める割合が50%を越える症例が53.2%と過半数を越えた。プレオマイシン感受性陽性群は31例(66.0%), 陰性群は(34.0%)であった。DNA ヒス

表4. BLM 感受性と DNA Histogram Pattern

DNA Histogram \ BLM 感受性	(+)	(-)	計
I	15	7	22
II	9	7	16
III	7	2	9
計	31	16	47(例)

BLM : プレオマイシン

(+) : 感受性陽性

(-) : 感受性陰性

トグラムパターンの各型とプレオマイシン感受性陽性群と陰性群の間に、特別な相関は認められなかった。

c) 肉眼型と DNA ヒストグラムパターンおよびプレオマイシン感受性 (表5)

食道癌の肉眼型は、食道癌取扱い規約²⁰⁾により、隆起型 (protruded), 表層型 (superficial), および潰瘍型 (ulcerative) に分類した。DNA ヒストグラムパターン II 型は16例中全例が潰瘍型であった。III 型も9例中7例(77.8%)と大部分が潰瘍型であった。しかし I 型では、22例中11例(50.0%)と半数に潰瘍型が認められた。その結果、II + III 型は I 型に比較して潰瘍型が有意 ($p < 0.01$) に多いことがわかった。

プレオマイシン感受性陽性群では、潰瘍型は31例中20例(64.5%)であったが、陰性群では16例中14例(87.5%)と多く、両群間に統計学的有意差 ($p < 0.05$)

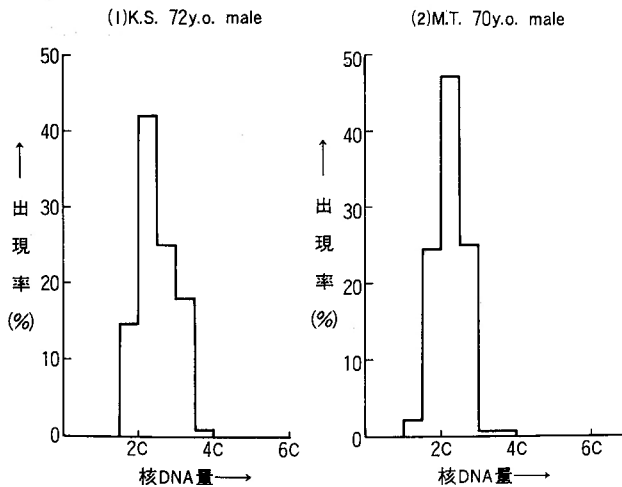


図4. 正常食道上皮の DNA ヒストグラム

表5. 肉眼型と DNA Histogram Pattern および BLM 感受性

肉眼型	BLM 感受性		DNA Histogram			計
	(+)	(-)	I	II	III	
Protruded	7	2	8	0	1	9
Superficial	4	0	3	0	1	
Ulcerative	20	*14	11	**16	7	34
計	31	16	22	16	9	47(例)

* ; P < 0.05

** ; P < 0.01

を認めた。

d) 組織型と DNA ヒストグラムパターンおよびブレオマイシン感受性 (表 6)

食道癌の組織型は、食道癌取扱い規約²⁸⁾により、高分化型 (well differentiated), 中分化型 (moderately differentiated), および低分化型 (poorly differentiated) に分類した。

DNA ヒストグラムパターン I 型に 5 例 (22.7%), II 型に 3 例 (18.8%) 低分化型を認めたが, III 型には低分化型を認めなかった。しかし各型の間組織型による統計学的有意差は認められなかった。

ブレオマイシン感受性陽性群では高分化型が 31 例中 19 例 (61.3%), 陰性群では 16 例中 7 例 (43.8%) に認められ, 陽性群は陰性群に比較して, 有意 ($p < 0.1$) に多く高分化型が存在した。

e) リンパ管侵襲所見と DNA ヒストグラムパターンおよびブレオマイシン感受性所見 (表 7)

DNA ヒストグラムパターンでは, ly(+) が I 型では 22 例中 10 例 (45.5%), II + III 型では 25 例中 19 例 (76.0%) に認められた。II + III 型は I 型に比較して有意

($p < 0.05$) に ly(+) が多いことがわかった。しかしブレオマイシン感受性陽性群と陰性群の間には, 相関が認められなかった。

f) リンパ節転移と DNA ヒストグラムパターンおよびブレオマイシン感受性 (表 8)

リンパ節転移は癌の深達度とともに, 最も重要な予後規定因子の 1 つとみなされている。食道癌取扱い規約²⁸⁾では, 食道癌のリンパ節転移は 1 群から 4 群まで分類されている。しかし今回は, リンパ節転移のあるもの n(+) と, 転移のないもの n(-) の 2 つに大きく分けて検討した。

DNA ヒストグラムパターン I 型は 22 例中 12 例 (54.5%), II 型は 16 例中 14 例 (87.5%), III 型は 9 例中 6 例 (66.7%) にリンパ節転移が認められた。II 型および II + III 型は I 型に比較して有意 ($p < 0.05$) にリンパ節転移陽性例が多かった。またブレオマイシン感受性陽性群は 31 例中 18 例 (58.1%) に, 陰性群は 16 例中 14 例 (87.5%) にリンパ節転移があり, 両群間に統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

g) 切除予後と DNA ヒストグラムパターンおよび

表6. 組織型と DNA Histogram Pattern および BLM 感受性

組織型	BLM 感受性		DNA Histogram			計
	(+)	(-)	I	II	III	
well	19	*7	10	9	7	26
moderately	7	*6	7	4	2	13
poorly	5	3	5	3	0	
計	31	16	22	16	9	47(例)

* ; P < 0.1

表7. リンパ管侵襲と DNA Histogram Pattern および BLM 感受性

リンパ管侵襲	BLM 感受性		DNA Histogram			計
	(+)	(-)	I	II	III	
Ly (-)	12	6	12	*4 —6— 2		18
Ly (+)	19	10	10	*12 —19— 7		29
計	31	16	22	16	9	47(例)

*; P<0.05

表8. リンパ節転移と DNA Histogram Pattern および BLM 感受性

リンパ節転移	BLM 感受性		DNA Histogram			計
	(+)	(-)	I	II	III	
n (-)	13	*2	10	*2	3	15
n (+)	18	*14	12	*14	6	32
計	31	16	22	16	9	47(例)

*; P<0.05

ブレオマイシン感受性

手術死および他病死を除く39例について、切除後の予後を2年生存率で検討した。

DNA ヒストグラムパターン I 型は2年生存率が66.7%, II+III型は28.6%で、両者の間に有意差(p<0.05)を認めた。ブレオマイシン感受性陽性群は42.3%, 陰性群は46.3%であったが、両群間に統計学的有意差を認めなかった。

h) その他の予後規定因子と DNA ヒストグラムパターンおよびブレオマイシン感受性

深達度, 血管侵襲, および腫瘍の長径についてそれぞれ検討したが、有意差は認められなかった。

2. 実験(ラット)乳頭腫および食道癌

a) 乳頭腫および食道癌の発生

MAN 投与開始後16~32週の間4週ごとに犠牲性剖検し、得られた標本を H. E. 染色し、組織学的に詳細に検討した。

乳頭腫は16~32週の全期間にわたって出現した。乳頭腫は食道の管腔内に向けて有基性ポリープ状に発育し、部位的には生理学的狭窄部に多発する傾向を示したが、24週をすぎると食道全体に多発するものが多かった。組織学的には、血管に富んだ粗な結合織がはっきりと分化した上皮に被覆されていた。上皮は過形成や過角化を伴っていたが、細胞異型は軽度で、いずれも

茎をもっていた(図5)。

食道癌は20週目にはじめて出現し、24週を過ぎると発癌しているものが多かった。部位的には食道上部が最も多く、次いで中部、下部の順であった。しかしほとんど差は認められなかった。組織学的には全例が中分化ないし高分化型扁平上皮癌であった(図6)。核 DNA 量の測定に用いたのは筋層以上に浸潤した進行癌である。また前胃部には乳頭腫も癌腫も全く認められなかった。

b) 実験食道癌と乳頭腫の核 DNA 量

mode 値, 平均値および DNA ヒストグラムパターンについて、乳頭腫20例, 食道癌20例で比較, 検討した。

(1) mode 値(表9)

乳頭腫では2c~3cにあるものが7例(35.0%), 3~4cにあるものが10例(50.0%), 4~5cにあるものが3例(15.0%)であった。良性の腫瘍でありながら mode 値が3cを越えるものが多く、4cを越える mode 値を示すものもあることは注目すべきことである。

食道癌では、2~3cに mode 値をもつものはなく、3~4cが12例(60.0%), 4~5cが8例(40.0%)であり、5cを越えて mode 値をもつものは認められなかった。

(2) 平均値(表10)

乳頭腫および食道癌ともに3c以下に平均値をもつ



図5. 乳頭腫 (24週目犠牲剖検)

H. E. 染色×40

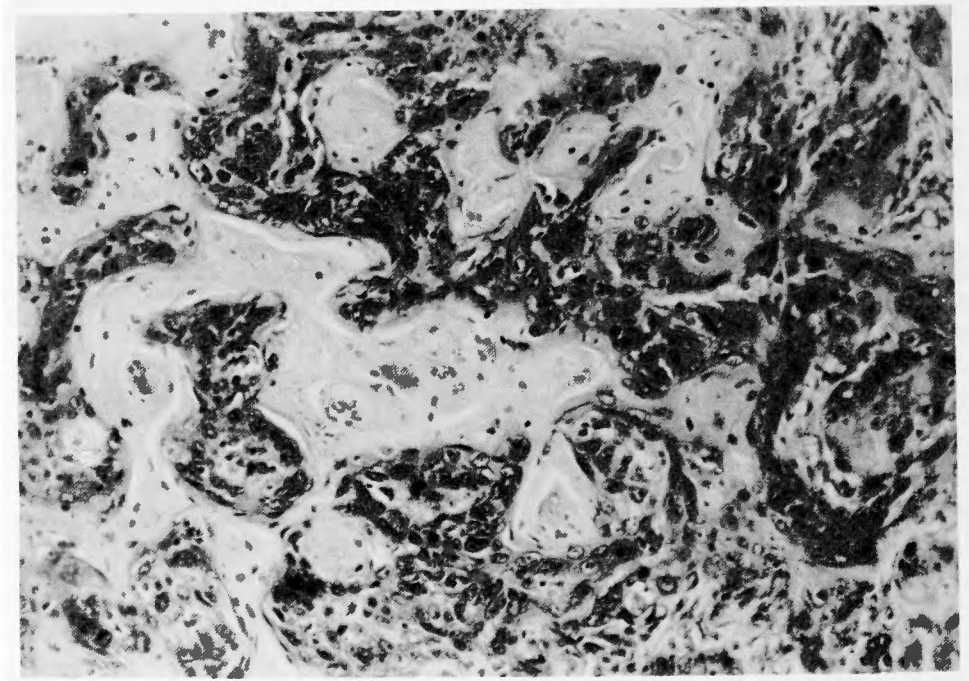


図6. 高分化型扁平上皮癌 (28週目犠牲剖検)

H. E. 染色×100

表9. 実験食道癌と乳頭腫

mode 値		
mode 値	乳頭腫	食道癌
2~3C	7例 (35%)	0例 (0%)
3~4C	10 (50)	12 (60)
4~5C	3 (15)	8 (40)
計	20 (100)	20 (100)

表10. 実験食道癌と乳頭腫

平均値		
平均値	乳頭腫	食道癌
3~3.5C	6例 (30%)	0例 (0%)
3.5~4.0	11 (55)	9 (45)
4.0~4.5	3 (15)	10 (50)
5.0以上	0 (0)	1 (5)

ものはなかった。乳頭腫では 3~4c の間に大部分 (85.0%) 平均値があったが、4~4.5c の間に平均値をもつものが3例(15.0%)に認められた。一方、食道癌では全例 3.5~5c の間に平均値があり、4c を越えるものと、越えないものがほぼ半数ずつ認められた。

(3) DNA ヒストグラムパターン (表11)

乳頭腫および食道癌ともⅢ型はなかった。乳頭腫ではⅠ型が90.0%と大部分を占めていたが、Ⅱ型も2例(10.0%)に認められた。食道癌では、Ⅰ型13例(65.0%)、Ⅱ型7例(35.0%)でⅠ型を多く認めたが、Ⅲ型は認められなかった。

表11. 実験食道癌と乳頭腫

DNA ヒストグラムパターン		
DNA ヒストグラムパターン	乳頭腫	食道癌
Ⅰ型	18例 (90%)	13例 (65%)
Ⅱ型	2 (10)	7 (35)
Ⅲ型	0 (0)	0 (0)
計	20 (100)	20 (100)

表12. 実験食道癌とヒト食道癌の比較

mode 値		
mode 値	実験食道癌	ヒト食道癌
2~3C	0例 (0%)	6例 (12.7%)
3~4C	12 (60)	21 (44.7)
4~5C	8 (40)	13 (27.7)
5C以上	0 (0)	7 (14.9)
計	20 (100)	47 (100)

c) 実験食道癌とヒト食道癌の核 DNA 量

mode 値, 分布の幅 (6c 以上の比率), および DNA ヒストグラムパターンについて, 20例の実験食道癌と47例のヒト食道癌について比較・検討した。

(1) mode 値 (表12)

実験食道癌では全例 3~5c に mode 値をもっており, 2~3c, あるいは5c 以上に mode 値をもつものはなかった。しかしヒト食道癌では, 2~3c に mode 値をもつものが12.7%, 5c 以上に mode 値をもつものが14.9%あり, 実験食道癌に比較して, 幅広く mode 値が存在することがわかった。

(2) 分布の幅 (6c 以上の比率) (表13)

DNA ヒストグラムの分布の幅をみるために, 6c 以上の細胞の出現する比率を調べて比較・検討した。

実験食道癌では, 20例中15例(75.0%)が6c 以上の比率が10%以内であり, 20%を越えるものは認められなかった。しかしヒト食道癌では, 6c 以上の細胞の比率が20%を越える症例が47例中18例(38.3%)あり, また6c 以上の比率が10%以内のものが47例中17例(36.2

表13. 実験食道癌とヒト食道癌の比較
分布の幅 (6C 以上の比率)

6C 以上の比率	実験食道癌	ヒト食道癌
0~10%	15例 (75%)*	17例 (36.2%)
10~20%	5 (25)	12 (25.5)
20%以上	0 (0)	18 (38.3)
計	20 (100)	47 (100)

*; P<0.01

表14. 実験食道癌とヒト食道癌の比較
DNA ヒストグラムパターン

DNA ヒストグラムパターン	実験食道癌	ヒト食道癌
I 型	13例 (65%)	21例 (44.7%)
II 型	7 (35)	17 (36.2)
III 型	0 (0)	9 (19.1)
計	20 (100)	47 (100)

%)に認められた。実験食道癌ではヒト食道癌に比較して、6c以上の細胞が出現する比率が10%以内のものが有意 ($p < 0.01$) に多いことがわかった。

(3) DNA ヒストグラムパターン (表14)

実験食道癌ではI型が20例中13例(65.0%)と過半数を越えているが、ヒト食道癌では47例中21例(44.7%)と50%以下であった。また実験食道癌では、悪性度が一番強いと考えられるIII型が認められなかったが、ヒト食道癌では9例(19.1%)に認められた。

IV 考 察

食道癌の治療は、①リンパ節の系統的郭清および再建法などの手術手技の確立、②麻酔および術前・術後の呼吸・循環の管理の進歩、③高カロリー輸液やEDの開発による術前・術後の栄養管理の進歩などによって、手術直接死亡率を問題とする時代はすぎ、術後遠隔成績の向上を企図する時代に至った。そして術後遠隔成績を改善するため、放射線療法、化学療法、および免疫療法が単独に、あるいは併用して用いられ、各施設により工夫がなされている。しかし5年生存率は20~30%以下とする報告^{13,29)}が多く、他の消化器系の癌と比較すると残念ながら良好とはいえない。ところで術後遠隔成績、すなわち予後を左右する因子とはどのようなものがあるのだろうか。腫瘍側の因子として現在用いられているものは、腫瘍の大きさ、X線型、肉眼型、組織型、深達度、脈管内侵襲、リンパ節転移、臓器転移、胸腹膜播種性転移、あるいはこれらのうちのいくつかを組合わせた臨床的進行度などである。術者の側からは根治度も予後を左右する因子である。また術前・術後の放射線療法、化学療法、免疫療法も当然術後遠隔成績を左右する因子である。

著者は以上述べたような臨床的および組織学的に現

われた悪性度ばかりでなく、癌細胞のもつ悪性度を直接数値で表現できないものかと考えた。そして近年細胞学的悪性度をよく反映するとして注目されている核DNA量を測定し、他の予後規定因子と比較・検討することとした。

また術前・術後の補助療法を施行する上で、癌の補助療法に対する感受性も予後を左右する重要な因子であると思われる。そこで著者は、現在補助療法のうちで最もよく使用されているプレオマイシンに対する食道癌の感受性について検査し、核DNA量とともに他の予後規定因子と比較・検討した。

Boivin³⁾, Mirsky¹⁹⁾らは、正常組織では体細胞1個あたりの核DNA量は常に一定であると述べている。しかし悪性腫瘍細胞では、正常細胞に比較して核DNA量が著明に増加するとともに、mode値の頻度の低下や、分布の幅の拡大が認められるという報告^{15,17,27)}が多くなされている。さらに癌細胞の核DNA量と臨床的悪性度や予後について検討を加え、予後良好な癌では低倍域に高いピーク値をもち、分布の幅も広がらないが、予後不良な癌では高倍域に低いピーク値をもち、分布の幅も広がっているという報告¹⁶⁾もある。しかし核DNA量と臨床的悪性度や予後は相関しないとする報告⁷⁾もある。また広瀬¹⁰⁾、今津¹²⁾らは胃の境界病変と癌について核DNA量から検討を加え、4c以上の細胞の比率によって境界病変と癌が判別できるとした。

以上の報告により、著者は4c以上の細胞の出現する比率に、分布の幅を加味すれば、癌の悪性度をかなり正確にとらえられるのではないかと考えて、DNAヒストグラムパターンを3型に分類した。

結果は、肉眼型、リンパ管侵襲、リンパ節転移および予後において、I型とII型あるいはII+III型の間に有意差を認めた。この結果は三戸の報告と多くの点で一致した。しかし組織型、深達度、血管侵襲および腫瘍の長径などについては、差が認められなかった。三戸²⁶⁾、徳岡³¹⁾、Zetterberg³⁴⁾らは、癌の組織型とDNAヒストグラムの間に相関がみられると報告しているが、相関がないという報告²⁾もある。著者の結果では相関が認められなかった。この点に関しては症例を増やし、さらに検討を加えることが必要であると思われる。しかしリンパ節転移および2年生存率において差が認められたので、4c以上の細胞の比率が50%を越えると、ヒト食道癌では悪性度が極めて増すことが推測された。

癌の制癌剤に対する感受性の有無が、それぞれの癌

細胞の固有の性格によっているものとするならば、それぞれの癌細胞の染色体、さらには遺伝子レベルまでの検索が必要であると思われる。しかし染色体あるいは遺伝子レベルまでの検索はなかなか困難であるので、染色体の間接的な観察方法である細胞核内 DNA 量を測定し、制癌剤の感受性と比較・検討した。INAS 法は東らによって開発された、核酸合成の阻害を指標とする制癌剤感受性試験である。プレオマイシンは DNA 合成阻害剤であり、INAS 法を適応することは正しいと思われる。

プレオマイシン感受性と DNA ヒストグラムパターンの比較では、感受性陽性群が I 型では 68.2% に認められ、II 型の 56.3% に比較して多く認められたが、統計学的有意差はみられなかった。しかし、肉眼型およびリンパ節転移では、I 型と陽性群は、他型あるいは他群に比較して、非潰瘍型や n(-) を有意に多く認めた。また DNA ヒストグラムパターンでは組織型で有意差を認めなかったが、感受性陽性群は、高分化型扁平上皮癌を有意に多く認めた。予後では陽性群と陰性群の間に差がなかったが、これは山口大学第 2 外科では、術後の補助療法に主として放射線治療を施行していることや、全例にプレオマイシンの投与が行われたのであるが、投与量がまちまちであったり、他の化学療法剤や免疫療法剤が併用されていたためと考えられる。今後正確な control study を行ってみる必要があると思われる。しかし、肉眼型では非潰瘍型、組織型では分化型扁平上皮癌、そしてリンパ節転移では n(-) にプレオマイシン感受性陽性例が多かったことから、これらの症例にはプレオマイシンの投与が効を奏するものと思われる。さらに非潰瘍型やリンパ節転移陰性例では、DNA ヒストグラムパターンからも悪性度の低い I 型が多く、プレオマイシン投与を含めた積極的な治療が望まれる。

発癌剤の投与による動物発癌モデルの作成は、発癌の経過観察あるいは治療効果の判定など、近代医学の癌研究において欠かさないものとなっている。1961年 Druckrey ら⁶⁾ によって N-methyl-N-nitrosoaniline の経口投与によりラットに高率に食道癌が発生することが報告されて以来、他の多くの N-ニトロソ化合物によって食道癌が発生することが確かめられ、ラットに食道癌を発生させることは容易になった。現在までラットの食道癌の観察は肉眼的および組織学的観察がほとんどで、核 DNA 量より観察し、ヒト食道癌と比較・検討した報告は少ない¹⁸⁾。また発癌過程で食道に

多発してくる乳頭腫は、前癌病変であるとする報告²⁰⁾、あるいは乳頭腫は癌化しないとする報告²⁵⁾もあり、見解が統一されていない。この 2 点を解明するために、ラットに MAN を投与し、乳頭腫および食道癌を発生させ、その核 DNA 量を測定した。

実験食道癌では悪性度の高い III 型はみられなかったが、ヒト食道癌では 19.1% に認められた。また実験食道癌では 2~3c あるいは 5c 以上に mode 値をもつものはなかったが、ヒト食道癌ではそれぞれ 12.7%、14.9% に認められた。また 6c 以上の比率でも、実験食道癌では 20% を越えるものはなく、ヒト食道癌に比較して分布の幅も狭いものが多かった。これらの違いは、実験食道癌では発癌の原因が発癌剤の投与だけであるために、比較的狭い範囲内に DNA ヒストグラムが局限されるが、ヒト食道癌では様々な原因が複合して発癌すると考えられるために、いろいろな DNA ヒストグラムパターンを呈するものと思われる。

良性病変と悪性病変を判別するのに、広瀬ら¹⁰⁾ が述べているように 4c 以上の比率が 5% を越えるものを悪性病変とするならば、乳頭腫の核 DNA 量の測定では、全例 4c 以上の細胞の出現する比率が 5% を越えていることから、乳頭腫は前癌病変であることが示唆された。さらに乳頭腫のなかには、DNA ヒストグラムパターン II 型を示すものもあり、DNA ヒストグラムからは食道癌と判別できないものも認められた。以上より、乳頭腫は前癌病変あるいは細胞学的には悪性を呈するものも一部存在すると考えられるが、さらに詳細な検討が必要であろう。

V 結 論

47 例の切除ヒト食道癌を対象として、核 DNA 量を測定し、核 DNA 量が悪性度を反映するかどうかを知るために、他の予後規定因子と比較・検討した。またプレオマイシンに対する感受性との関連性についても検討した。その結果、以下の知見を得た。

(1) 4c 以上の細胞の比率が 50% を越えない群では、50% を越える群に比較して、肉眼型では非潰瘍型が ($p < 0.01$)、リンパ管侵襲所見では ly(-) が ($p < 0.05$)、リンパ節転移では n(-) が ($p < 0.05$)、有意に多く、2 年生存率も有意 ($p < 0.05$) に良好であった。

(2) プレオマイシン感受性陽性群は陰性群に比較して、肉眼型では非潰瘍型が ($p < 0.05$)、組織型では高分化型が ($p < 0.1$)、リンパ節転移では n(-) が ($p < 0.05$)、有意に多く認められた。

(3) 以上より、核 DNA 量は予後規定因子として有用であると思われた。また非潰瘍型でリンパ節転移陰性例では、核 DNA 量からは悪性度の低いものが多く、またプレオマイシンに対する感受性も陽性例が多いことより、積極的な治療が効を奏すると思われた。

次にラットにN-メチル-N-アミルニトロサミンを投与し、各20匹の乳頭腫および実験食道癌を作成して、核 DNA 量を測定し、以下の知見を得た。

(4) 実験食道癌とヒト食道癌の比較では、実験食道癌には DNA ヒストグラムパターンⅢ型を認めず、また mode 値や分布の幅に差を認めた。

(5) 乳頭腫の核 DNA 量では、全例に4c以上の細胞が5%以上出現し、DNA ヒストグラムパターンでも癌と同様なパターンを示す例が認められた。

(6) 以上より、実験食道癌とヒト食道癌の間にはいくつもの相異点があり、また乳頭腫が前癌病変であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました、石上浩一教授に深く感謝の意を表するとともに、今回の実験に御協力いただいた教室諸兄に深謝します。

なお本論文の要旨は、第26回日本胸部外科学会関西地方会および、第36回日本胸部外科学会総会において発表した。また本研究の一部は昭和58年度および昭和59年度厚生省がん研究助成金、課題番号58-33によったことを付記する。

文 献

- Atkin NB: Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. *Brit Med J* **29**: 271-272, 1972.
- Atkin NB, Richards BM, et al: The deoxyribonucleic acid content of carcinoma of the uterus: An assessment of its possible significance in relation to histopathology and clinical course, based on data from 165 cases. *Brit J Cancer* **13**: 773-787, 1971.
- Boivin A, Vendrely R, et al: Leuchtenberger C, et al (17) より引用.
- Caspersson T: Methods for the determination of the absorption spectra of cell structures. *J Roy Microsc Soc* **60**: 8-25, 1940.
- Caspersson TO: Quantitative tumor cytochemistry-G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research* **39**: 2341-2355, 1979.
- Druckrey H, Preussmann R, et al: Erzeugung von Karzinomae der Speiseröhre durch unsymmetrische Nitrosamine. *Naturwissenschaften* **50**: 100-101, 1963.
- Greisen O: Deoxyribonucleic acid content in bronchogenic carcinoma with special reference to polypoid cell nuclei. *Acta Path Microbiol Scand* **77**: 177-186, 1969.
- 東弘, 森武貞, 他: 適応制癌剤の選択一主として INAS 法について一. *外科治療* **33**: 253-260, 1975.
- 東弘, 天方大弼, 他: 核酸生合成の阻害効果を指標とした制癌剤感受性試験 INAS 法について. *最新医学* **33**: 2263-2269, 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.
- 飯塚紀文: 食道癌に対する併用化学療法. *外科治療* **41**: 424-428, 1979.
- 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. *神戸大学医学部紀要* **38**: 73-92, 1978.
- 葛西森夫, 渡辺登志男: 食道癌治療法の選択. *消化器外科セミナー* **7**: 21-35, 1982.
- 片山憲持, 和田達雄: 胸部食道癌の手術適応基準と術前治療. *消化器外科* **3**: 21-35, 1980.
- 加藤治文, 早田義博: 肺扁平上皮癌の発癌過程と DNA 分析一気管支上皮扁平上皮化生, Carcinoma in situ 及び角化扁平上皮癌の細胞について. *肺癌* **17**: 267-278, 1977.
- 小島吉雄: 人癌における DNA 量と染色体. *日本臨床* **19**: 2295-2303, 1961.
- Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, et al: A microspectrophotometric study of the desoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues. *Am J Path* **30**: 65-85, 1974.
- 松浦弘, 森正樹, 他: 核 DNA 量からみた実験食道癌とヒト食道癌の対比. 第34回食道疾患研究会プログラム集 (松江) p. 59, 1983.
- Mirsky AE, Ris H: The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J Gen Physiol* **34**: 451-462, 1951.
- 鍋谷欣市: 各科領域癌の早期発見上の問題点一食道癌. *癌の臨床* **24**: 882-887, 1978.
- Naora H: Microspectrophotometry and cytochemical analysis of nucleic acid. *Science* **114**: 279-285, 1951.
- 日本組織細胞化学会編: 組織細胞化学1982. 学際企画, p. 229, 1982.
- Pollister AW, Moses MJ: A simplified apparatus for photometric analysis and photomicrography. *J Gen Physiol* **32**: 567-574, 1949.
- Pozhariski KM: Tumors of the oesophagus. In *Pathology of Tumors in Laboratory Animals*, volume 1-tumors of the rat, part 1 edited by Tursov VS, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1973, p. 87.
- Reuber MD: Histopathology and neoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting

- diethylnitrosamine. *J Nat Cancer Inst* **58**: 313-321, 1977.
- 26) 三戸康郎, 平塚隆三, 他: 細胞核内 DNA 分析による癌の悪性度分類に関する研究—胃および食道癌を対象として. *日消外会誌* **15**: 531-543, 1982.
- 27) 篠塚孝男: 顕微分光測光法による子宮頸癌各種病変の核 DNA 解析. *日臨細会誌* **14**: 112-120, 1975.
- 28) 食道疾患研究会編: 食道癌取扱い規約 (第5版), 金原出版, 1976.
- 29) 杉町圭蔵, 井口潔: 食道癌再発の現況とその予防対策. *外科 MOOK* **24**: 140-148, 1982.
- 30) 武内忠男, 小川和朗, 他編: 新組織化学, 朝倉書店, p. 124, 1975.
- 31) 徳岡潤三: 悪性腫瘍細胞の核内 DNA 量に関する研究. *癌の臨床* **11**: 133-141, 1965.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) Zetterberg A, Esposti PL: Cytophotometric DNA-analysis of aspirated cells from prostatic carcinoma. *Acta Cytologica* **20**: 46-57, 1976.