

前立腺癌における Flow cytometric DNA analysis の臨床的有用性

大阪医科大学泌尿器科学教室 (主任: 宮崎 重教授)

石 川 朱 実

THE CLINICAL USEFULNESS OF FLOW CYTOMETRIC DNA ANALYSIS IN PROSTATIC CANCER

Akemi Ishikawa

From the Department of Urology, Osaka Medical School

Flow cytometry was used to measure the DNA content in archival paraffin-embedded prostatic cancer specimens from 54 patients with known outcomes. The specimens were obtained by transurethral resection of the prostate. DNA ploidy as a predictor of prognosis was compared with histological grade and clinical stage.

Although no significant correlation between histological grade or clinical stage and ploidy pattern was demonstrated, an increased percentage of DNA aneuploid tumors was seen in higher histological grade and in advanced clinical stage. The survival rate calculated by Kaplan-Meier analysis showed that DNA ploidy pattern was a more reliable indicator to predict survival probability than histological grade or clinical stage. All patients with a near diploid pattern (11 patients) survived more than 5 years, whereas all those with an aneuploid pattern (21 patients) died within 3.5 years. Of 22 patients with a tetraploid pattern, 15 died of tumor progression within 5 years. The remaining 7 patients with favorable outcome had a relatively lower proliferation index (<65) in DNA histogram and none of them suffered from stage D disease.

In conclusion, the results from this retrospective study suggest that flow cytometric DNA analysis in prostatic cancer would be useful as a means of providing prognostic information.

(Acta Urol. Jpn. 38: 665-670, 1992)

Key words: Prostatic cancer, Flow cytometry, DNA histogram

緒 言

前立腺癌の自然経過は多種多様であり、長期にわたって潜在したまま表面化しないものもあれば、短期間で死に至るものまでさまざまである。そのため前立腺癌患者の治療に際しては、癌の悪性度を正確に把握し、的確な予後を判定することが重要な課題のひとつになっている。

現在、前立腺癌の悪性度の評価および予後推測の指標として組織学的分類と病期分類がおもに用いられている。ルーチンの病理組織学的診断は良性と悪性の区別には有用であるが、悪性度を正確に判定するためにはかなりの時間と労力が必要である。Gleason score も予後推測の指標としてよく用いられているが、客観性に乏しいという欠点がある。また、予後推測の指標として用いられている病期分類も必ずしも正確なもの

ではない。

近年、短時間に数多くの細胞についての分析を可能とする Flow cytometry (FCM) が普及し、DNA、RNA、蛋白質、細胞表面抗原、細胞内抗原などの測定に應用されている。

前立腺癌についても FCM による核 DNA 分析 (FCM-DNA 分析) に関する種々の報告があるが、ploidy 分類と組織学的分類および病期分類の関係については、いまだ一定した見解はえられていない¹⁻¹⁰⁾。そこで、今回著者は前立腺組織のパラフィン包埋切片を試料として FCM-DNA 分析をおこない、前立腺癌の悪性度評価および予後推測における臨床的有用性を retrospective に検討した。

対象および方法

大阪医科大学泌尿器科およびその関連施設におい

て、診断確定後5年以上臨床経過の明らかな前立腺癌患者54例を対象とした。年齢は53歳から94歳で平均70.9歳であった。54例中には癌死した36例を含んでいる。また5年以上生存した18例には癌死した症例はなかった。初期治療は、病期にかかわらず、原則として組織学的分類が well differentiated adenocarcinoma (wel) と診断された症例は、去勢術とジエチルスチルベストロールジフォスフェイトの投与、moderately differentiated adenocarcinoma (mod), poorly differentiated adenocarcinoma (por) と診断された症例は、去勢術とリン酸エストラムスチンの投与が行われていた。

経尿道的前立腺切除術 (TUR-P) によってえられた前立腺組織をパラフィン包埋切片とし、病理診断用および FCM-DNA 分析用とした。病理診断用と FCM-DNA 分析用の試料は連続切片とした。FCM-DNA 分析用のパラフィン包埋切片は、まずマイクロームを用いて 50 μ m にスライスし、これにキシレン 3 ml を加えて攪拌した後、15分間静置した。これを2回繰り返して脱パラフィンした試料に、100%エタノールを 3 ml 加えて攪拌後、15分間静置し、上清を吸引除去し、95%, 70%, 50%エタノールを順次 3 ml ずつ加えて同様に処理した。その後蒸留水 3 ml を加えて攪拌し、10分間静置して、上清を吸引除去した。この操作をもう一度繰り返して再水和を完了した後、試料周囲の TUR-P による凝固部分を剪刀を用いて除去した。再水和した試料に 0.5% ペブシン生理食塩水溶液を 2 ml 加え、37°C にて振盪しながら60分間培養して単細胞に分離した。4°C 1,800 rpm にて遠沈後上清を吸引除去し、phosphate buffered solution にて単細胞を2回洗浄した後、48 μ m のナイロンメッシュにて濾過し、Hedley らの方法¹¹⁾ に準じて propidium iodide により核 DNA 染色を行った。DNA 分析には CS-20 型 Cell Sorter (昭和電工) を用い、約3万個の細胞について測定した。diploid standard としてはヒト末梢血リンパ球を用い、2C peak が 30 channel となるように Cell Sorter を調節した。CV 値は4.0~8.0であった。

FCM-DNA 分析による腫瘍の悪性度の指標としては ploidy 分類と proliferation index (P.I.) を用いた。ploidy 分類は、著者ら¹²⁾ が以前行った研究成績を参考にして、4n ピークをなす細胞が全体の15%未満のヒストグラムを near diploid pattern, 15%以上のものを tetraploid pattern とし、aneuploid peak を呈するものを aneuploid pattern とした。P.I. とは 2n 以上の細胞 (hyperdiploid cell) の全

体に対する割合であり、この P.I. が大きいヒストグラムほどその組織の悪性度は高いといわれている¹³⁾。

組織学的分類と病期分類は、前立腺癌取り扱い規約に従って判定した。また、病期は、前立腺触診、膀胱鏡検査、骨盤部 CT、精嚢造影、骨シンチ、全身 Ga シンチの所見を総合して決定した。

FCM-DNA 分析による ploidy 分類と組織学的分類および病期分類とを比較検討した。つぎに、ploidy 分類、組織学的分類および病期分類別にみた、それぞれの Kaplan-Meier 法による5年生存曲線を比較した。また、癌死した症例と5年以上生存した症例との相違を ploidy 分類、組織学的分類、病期分類および P.I. について比較検討した。最後に P.I. と生存年数との関係について検討した。

なお、統計学的有意差検定には Cox-Mantel 法を用いた。

結 果

54例についての ploidy 分類と組織学的分類との関係を Table 1 に示した。組織学的分類で well differentiated adenocarcinoma (wel) と診断された17例について ploidy 分類をみると、near diploid が8例、tetraploid が7例、aneuploid が2例であった。moderately (mod) の18例では、near diploid が2例、tetraploid が6例、aneuploid が10例であった。poorly (por) の19例では、near diploid は1例のみであり、tetraploid と aneuploid はともに9例ずつであった。

ploidy 分類と病期分類の関係については Table 2 に示した。なお、ploidy 別、組織型別および病期別に分類した各症例間の年齢には有意差はなかった。

前立腺癌と診断された時点からの生存曲線を Kaplan-Meier 法を用いて組織学的分類、病期分類、ploidy 分類別にそれぞれ Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 に示した。

組織学的分類別にみた生存曲線では、wel の生存率

Table 1. The relationship between ploidy pattern and histological grade

		histological grade			
		well	moderately	poorly	total
ploidy pattern	near diploid	8	2	1	11
	tetraploid	7	6	9	22
	aneuploid	2	10	9	21
total		17	18	19	54

は1年目で94%，3年目で76%，5年目で71%であり mod の1，3，5年生存率はそれぞれ87%，46%，33

Table 2. The relationship between ploidy pattern and clinical stage

	stage				total
	A	B	C	D	
near diploid	3	4	3	1	11
tetraploid	4	6	3	9	22
aneuploid	1	2	6	12	21
total	8	12	12	22	54

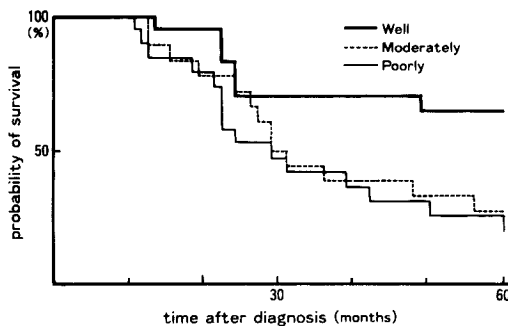


Fig. 1. Histological grade and survival curve

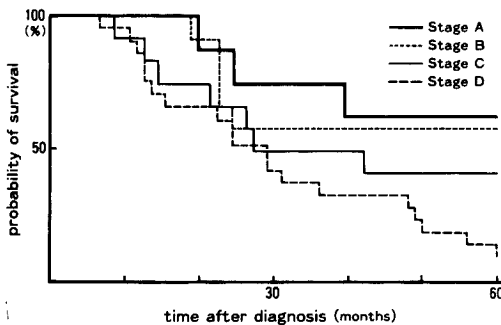


Fig. 2. Clinical stage and survival curve

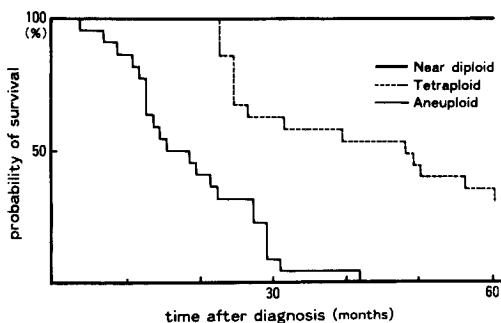


Fig. 3. Ploidy pattern and survival curve

%であった。por の生存曲線は mod とほぼ同様であった。wel の生存曲線と mod および por の生存曲線の間には有意差が認められた ($p < 0.03$, $p < 0.006$)。

Fig. 2 の病期分類別に見た生存曲線では，stage A, B, C, D の5年生存率はそれぞれ62%，58%，42%，10%であった。stage A の生存率は stage D に比して6カ月以降で有意に高かった ($p < 0.007$) が，他の病期間には有意差はなかった。

Fig. 3 には ploidy 分類別に見た生存曲線を示したが，near diploid と判定された症例では5年以内に死亡したものはなかった。tetraploid と判定された症例の1，3，5年生存率はそれぞれ100%，59%，36%であった。aneuploid と判定された症例は3年6カ月以内に全例死亡していた。この3群間にはいずれも有意差は認められた ($P < 0.00054$)。

Table 3 では，54症例をまず near diploid, tetraploid, aneuploid の3段階に分類した後，それぞれの段階内において P.I. の小さな順に症例を並べ，FCM-DNA 分析による悪性度評価の低いものから順に1～54の症例番号を付けた。各症例について5年以上の生存例は白丸で，5年以内に死亡した症例は黒丸で示した。near diploid と判定された11症例は，Fig. 3 でも示したように，組織型，病期および P.I. にかかわらず全例5年以上生存していた。また，aneuploid と判定された21例も組織型，病期，P.I. に関係なくすべて3年6カ月以内に死亡していた。tetraploid と判定された22例の5年生存率を組織型，病期，P.I. についてみると，組織型に関しては wel では42.9% (3/7)，mod では33.3% (2/6)，por では22.2% (2/9) であった。病期については，A, B, C, D それぞれ50% (2/4)，50% (3/6)，66.7% (2/3)，0% (0/9) であった。P.I. については P.I. が66以上であった症例27～33はすべて死亡していたが，症例12～26については一定の傾向はみられなかった。

癌死した36例については，tetraploid および aneuploid のいずれにおいても，P.I. と生存年数の間には一定の関係は認められなかった。

考 察

細胞内の核 DNA を分析することにより，癌の診断，悪性度の判定に役立てようとする試みは，1970年代の前半に FCM-DNA 分析が一般に利用できるようになって以来，臨床の各分野で盛んに行われるようになった。前立腺癌における FCM-DNA 分析の応用は1970年代に Sprenger ら¹⁴⁾により始められ，1983年には Hedley ら¹⁵⁾がパラフィン包埋標本を使用した

Table 3. The relationship among histological grade, clinical stage, ploidy pattern and proliferation index

DNA histogram pattern	症例番号	PI	histological grade			stage				○ 生存例 ● 死亡例
			well	moderately	poorly	A	B	C	D	
near diploid	1	12		○		○				
	2	24	○				○			
	3	26	○			○				
	4	31								
	5	33		○				○		
	6	34	○				○			
	7	39	○			○				
	8	47					○			
	9	48			○				○	
	10	51	○					○		
	11	54	○					○		
tetraploid	12	27	○			○				●
	13	29		●						●
	14	30								●
	15	31	○							●
	16	35			●		○			●
	17	42			●					●
	18	45			●		●			●
	19	46		○	●		●			●
	20	50			●		●			●
	21	53	●		●					●
	22	54	●		○		●	○		●
	23	60		○						●
	24	60					○			●
	25	62	○		○	○		○		●
	26	63								●
	27	66		●	●					●
	28	66			●					●
	29	70	●		●	●				●
	30	79		●	●			●		●
	31	80			●					●
	32	81		●	●	●				●
	33	88								●
aneuploid	34	40		●	●					●
	35	41			●					●
	36	41			●					●
	37	44		●						●
	38	45	●		●					●
	39	45			●					●
	40	56		●	●					●
	41	62	●		●					●
	42	63			●					●
	43	64			●		●			●
	44	65			●					●
	45	67		●	●	●				●
	46	76			●					●
	47	76		●	●					●
	48	76		●	●					●
	49	79			●					●
	50	84		●						●
	51	85		●						●
	52	85		●						●
	53	91		●						●
	54	96			●		●	●		●

FCM-DNA 分析について報告している。

前立腺癌の FCM-DNA 分析の際に、まず問題となるのはその組織採取方法である。臨床的に比較的可易な組織採取方法としては、経直腸的 fine needle aspiration biopsy, 経会陰的針生検および TUR-P がある。いずれもかなり正確な DNA ヒストグラムがえられるが、aspiration biopsy では retrospective study は不可能であり、また経会陰的針生検組織のパラフィン包埋切片では FCM-DNA 分析に必要な量の細胞数がえられないことが多いため、著者は TUR-P によってえられた組織標本を用いた。また、ヒストグラム上のノイズを減少させるために、電気凝固の影響があると思われる TUR-P 切片の周囲部分を十分に除去し、中央部のみを用いて測定した¹²⁾。

前立腺癌における組織学的分類と ploidy 分類の関係については、現在のところ一定した見解はえられていない。Tribukait ら¹⁾は300例の未治療前立腺癌患者を対象に、fine needle aspiration biopsy によりえ

られた試料を用いて FCM-DNA 分析を行った結果、aneuploid pattern を示す割合は well differentiated adenocarcinoma (wel) で39%, moderately (mod) で78%, poorly (por) で97%であり、FCM-DNA 分析による aneuploid の出現率と組織型との間には有意な相関関係があると報告している。Neill ら²⁾, Fordham ら³⁾も ploidy pattern と組織型とは相関しており、組織学的分化度の高い腫瘍は正常に近いヒストグラムを示し、低い腫瘍は aneuploid を示すと報告している。これに対して、Lundberg ら⁴⁾, Willumsen ら⁵⁾は両者の間には相関関係はないと報告している。今回の著者の成績では、組織学的分類と ploidy 分類との間には有意な相関はみられなかったが、組織学的分化度が低くなるほど aneuploid が増える傾向は認められた。

FCM-DNA 分析と病期との関係については、Dejter ら⁶⁾は69例の未治療前立腺癌患者について retrospective study を行い、stage B (51例) の97.3%

は diploid pattern を, stage D (18例) の 72.2% は aneuploid pattern であったと報告している. Fordham ら³⁾, Frankfurt ら⁷⁾ も病期が進行するほど aneuploid の出現率が高くなり, 両者の間には有意な相関関係があると報告している. しかし, Willumsen ら⁵⁾, Neill ら²⁾ は, 両者の間には相関関係はなかったと報告している. 著者の結果では, 組織学的分類の場合と同様に, 病期が進行するに従って ploidy pattern も悪くなる傾向があったが, 有意な相関は認められなかった.

Fordham ら³⁾ の prostatectomy を受けた前立腺癌患者72例のパラフィン包埋切片を用いた組織学的分類および ploidy 分類別にみた生存曲線についての報告では, wel と por の生存曲線には有意差があり, 5年生存率はそれぞれ80%, 20%であった. また, diploid pattern, aneuploid pattern の生存曲線の間にも有意差があり, 5年生存率はそれぞれ70%, 20%であったと述べている. 著者の結果では, 組織学的分類別にみた生存曲線では mod と por の生存曲線は5年間を通してほぼ同様であり, wel の生存曲線は mod および por に比して有意に良好であった. 病期分類別にみた生存曲線では, stage A は stage D に比して有意に良好であったが, 他の病期間には有意差は認められなかった. 一方, ploidy 分類別にみた生存曲線では, near diploid, tetraploid および aneuploid の3者間には明らかな有意差が認められた. Mayo Clinic⁸⁻¹⁰⁾ の調査でも, stage B, C, D₁ の前立腺癌患者では ploidy 分類は予後推測のよい指標であると報告されている.

以上の結果から, 生命予後推測の手段として, ploidy 分類は, 組織学的分類, 病期分類よりも, より信頼性が高いと考えられた.

組織学的分類, 病期分類, ploidy 分類および P.I. の4者の関係をみると, near diploid と判定されたものは, 組織型, 病期および P.I. にかかわらず5年以上生存しており, aneuploid と判定された症例は, 組織型, 病期および P.I. にかかわらず全例3年6カ月以内に死亡していた. tetraploid と判定された症例では22例中15例が死亡していたが, その内訳をみると, stage D の9例は組織型にかかわらずすべて死亡していた. また, P.I. が66以上の症例27~33も全例死亡していた. 残りの P.I. が65以下で, 病期がA~Cである10例中死亡した症例18, 20, 22についてみると, 症例18, 20は積極的な治療が行われていなかった. 従って, 症例22を除けば, tetraploid pattern を呈し P.I. が65以下の症例は, 病期がC以下であ

ばかり良好な生命予後が期待でき, tetraploid pattern で P.I. が66以上であれば病期にかかわらず生命予後は悪いと判定できると考えられた.

今回著者は, TUR-P により採取されすでに保存されているパラフィン包埋標本を用いて FCM-DNA 分析を行ったが, パラフィン包埋されている前立腺組織は, 癌細胞の存在する組織をすべて採取しているとはいいがたく, 腫瘍の一部のみしか観察していない可能性が高い. 今後, 広範囲に採取した癌組織を用いて組織学的診断を行い, FCM-DNA 分析との比較を行えば, さらに正確な結果がえられると思われる.

P.I. については, Schultz ら¹³⁾ の報告にもあるように, その値が大きいほど腫瘍の悪性度は高いといわれている. そこで著者は, P.I. と生存期間との関係についても検討したが, 今回の成績では両者の間に一定の傾向はみられなかった. その原因としては, パラフィン包埋標本を用いた場合はミクロトームで薄切する際に核が切断されてヒストグラム上ノイズが増加し, また, ホルマリン固定の影響により核の染色性にむらができやすくなり, P.I. に関しては分析結果がかなり不正確になるためではないかと考えられた. 従って, 新鮮標本を用いた FCM-DNA 分析を行えば, P.I. と生存期間との間にも有意な関連性が見出される可能性があると思われる.

結 語

予後の明らかな前立腺癌患者54例を対象として, 経尿道的前立腺切除術によってえられた組織のパラフィン包埋切片を用いて FCM-DNA 分析を行い, 組織型, 病期と比較しながら, FCM-DNA 分析の臨床的有用性について検討した. その結果,

- 1) ploidy 分類と組織学的分類の間には有意な関連性はみられなかったが, 組織学的分化度が低い程 aneuploid が増える傾向があった.
- 2) ploidy 分類と病期分類の間にも有意な関連性はみられなかったが, 病期が進行する程 aneuploid が増える傾向があった.
- 3) 生存曲線についてみると, 組織学的分類, 病期分類よりも, ploidy 分類の方が生命予後とよく相関している傾向があった.
- 4) near diploid pattern と判定された症例は全例5年以上生存しており, aneuploid と判定された症例は全例3年6カ月以内に死亡していた. tetraploid と判定された症例は proliferation index (P.I.) が65以下で病期がC以下であれば生命予後は良好であった.

以上より, FCM-DNA 分析は前立腺癌の悪性度評価, 予後推測における指標として有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました宮崎 重名教授に厚く感謝の意を表します。また, 研究にあたり直接御指導をいただきました岡田茂樹講師に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第77回日本泌尿器科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Tribukait B, Ronstrom L and Esposti PL: Quantitative and qualitative aspects of flow DNA measurements related to the cytologic grade in prostatic carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 5: 107-111, 1983
- 2) Neill WA, Norval M and Habib FK: Nuclear DNA analysis of prostate tissues: Correlation with stage and grade of tumour. *Urol Int* 44: 141-146, 1989
- 3) Fordham MVP, Burdge AH, Matthews J, et al.: Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical outcome. *Br J Surg* 73: 400-403, 1986
- 4) Lundberg S, Carstensen J and Rundquist I: DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res* 47: 1973-1977, 1987
- 5) Willumsen H, Thorup J, Norgaard T, et al.: Nuclear DNA content in prostatic carcinoma measured by flow cytometry: A retrospective study on paraffin-embedded tissue. *APMIS Suppl* 4: 120-125, 1988
- 6) Dejter SW, Moul JW, Cunningham RE, et al.: Prognostic significance of DNA ploidy in carcinoma of prostate. *Urology* 33: 361-366, 1989
- 7) Frankfurt OS, Chin JL, Englander LS, et al.: Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res* 45: 1418-1423, 1985
- 8) Montgomery BT, Nativ O, Blute ML, et al.: Stage B prostatic adenocarcinoma, Flow cytometric Nuclear DNA ploidy analysis. *Arch Surg* 125: 327-331, 1990
- 9) Nativ O, Winkler HZ, Raz, Y, et al.: Stage C prostate adenocarcinoma: Flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin Proc* 64: 911-919, 1989
- 10) Winkler HZ, Rainwater LM, Myers RP, et al.: Stage D1 prostatic adenocarcinomas: Significance of nuclear DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 63: 103-112, 1988
- 11) 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
- 12) 神原朱実, 岡田茂樹, 川崎利博, ほか: Flow cytometric DNA analysis に際しての前立腺組織採取方法の検討. *泌尿器外科* 7: 701-705, 1989
- 13) Schultz RE, Varello MA, Kwan CT, et al.: Simultaneous flow cytometric deoxyribonucleic acid and acid phosphatase analysis of benign and malignant lesions of the prostate. *J Urol* 134: 1133-1136, 1985
- 14) Sprenger E, Volk L, and Michaelis WE: The significance of nuclear DNA-measurements in the diagnosis of prostatic carcinomas. *Beitr Path Bd* 153: 370-378, 1974

(Received on September 3, 1991)
(Accepted on November 15, 1991)