

---

# Flow Cytometry による膀胱腫瘍細胞の解析

---

研究課題番号 : 62570715

昭和63年度科学研究費補助金(一般研究C)

平成元年12月

研究代表者 八竹 直

(旭川医科大学・医学部・教授)

研究組織

研究代表者：八竹 直

（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：橋本 博

（旭川医科大学・医学部・講師）

研究経費

昭和62年度	1200千円
昭和63年度	700千円
計	1900千円

## 目 的

フローサイトメトリー ( Flow Cytometry, FCM ) により、腫瘍細胞の核 DNA 量が簡便に測定できるようになり、DNA ploidy が腫瘍の悪性度の 1 つの指標として、評価されつつある。本研究では FCM により求めた膀胱腫瘍細胞の DNA ploidy と症例の予後等との関連性を分析し、膀胱腫瘍の臨床における、核 DNA 量測定の有用性を検討した。

## 対 象

旭川医大泌尿器科において1977年から1988年の間に膀胱全摘を行なった、原発性膀胱腫瘍68例の内、測定に十分な組織が得られた、移行上皮癌47例を検討の対象とした。全摘標本における深達度別症例数は、T<sub>a</sub>1例、T<sub>0</sub>5例、T<sub>1a</sub>5例、T<sub>1b</sub>8例、T<sub>2</sub>8例、T<sub>3a</sub>10例、T<sub>3b</sub>7例、T<sub>4</sub>3例であった。なお、T<sub>0</sub>の5例を含む41例に術前照射(20~40Gy)を行なった。

## 方 法

FCM 分析は、当院病理部に保存されている上記症例のパラフィンブロックを用い、Hedley et al. の方法 (J. Histochem. Cytochem. 31, 1333-1335, 1983.) に準じて下記のように行なった。

1、パラフィンブロックより、50 $\mu$ m の切片を切り出す (組織の大きさにより 1~4 枚)。

2、切片を、xylene で脱パラフィン (10分 2回) し、100%、95%、70%、50% (各 10分) の ethanol 系列で親水化した。

3、蒸留水で 2回洗浄後、0.2% pepsin (半井化学)、0.9% NaCl、pH 1.5 の溶液中で、37 $^{\circ}$ C、90分処理し、細胞単離、裸核化を行なった。

4、phosphate buffer saline (PBS, 0.01M, pH 7.2) を加え、反応を停止させた後、遠沈 (1000 r.p.m., 10 min.) し、細胞核よりなる沈殿物を得た。

5、50  $\mu$ g/ml propidium iodide (Hoechst) 1mg/ml ribonuclease A (Sigma) (in PBS) にて再浮遊し、室温25分反応させた。

6、nylon mesh (40  $\mu$ m pore) で濾過し、当大学機器センター保有の昭和電工社製CS-20にて10000個の細胞を測定した。

7、DNA ヒストグラムの解析は、Fossa et al. (Path. Res. Pract. 181, 200-205, 1986.) の報告に従って行なった。すなわち、標準サンプルは用いず、最も低い channel number の peak (first peak) を diploid peak と判定することとし、single peak の場合は diploid とした。複数の peak が見られた場合、first peak の channel number に対する他の peak の channel number の比を計算し、その値が 1.90 から 2.10 の範囲にあれば、そのサンプルは diploid とし、その範囲を逸脱する channel に peak を有する場合には non-diploid と判定した。

## 結 果

### 1、細胞異型度と DNA ploidy

47症例の内、37症例で照射の影響のないサンプル（照射例では治療前の生検組織、非照射例では全摘組織）を解析できた。各々の異型度における non-diploid の比率は、grade 1 (G1) - 25% (1/4), grade 2 (G2) - 25% (3/12), grade 3 (G3) - 48% (10/21)であった。

照射後の全摘組織は35例で解析でき、non-diploid の比率は、G1 - 50% (1/2), G2 - 60% (3/5), G3 - 46% (13/28)であった。照射の有無を考慮せず、両者の結果を合算すると、G1 - 33% (2/6), G2 - 35% (6/17), G3 - 47% (23/49)であった。解析したすべてのサンプルにおける non-diploid の比率は、43% (31/72)であった。

### 2、治療前（臨床的）深達度と DNA ploidy

上記の、照射の影響のないサンプルで測定可能であった37例について検討した。

各々の臨床的深達度における non-diploid

の比率は、T1 - 33% (2/6), T2 - 50% (6/12), T3 - 29% (5/17), T4 - 50% (1/2)であった。

### 3、病理学的深達度とDNA ploidy

術前照射施行後に膀胱全摘を施行した症例中、解析可能であった35例におけるnon-diploidの比率は、Ta - 100% (1/1), T1a - 75% (3/4), T1b - 29% (2/7), T2 - 57% (4/7), T3a - 33% (3/9), T3b - 50% (3/6), T4 - 100% (1/1)であった。照射非施行例では、T1a - 0% (0/1), T1b - 100% (1/1), T2 - 100% (1/1), T3a - 100% (1/1), T3b - 0% (0/1), T4 - 0% (0/1)であった。

### 4、照射前のploidyとdownstagingとの関連性

照射前のploidyと照射後のdownstagingの有無が、共に判明した症例は31例であった。照射前diploidの症例20例の内、7例(35%)にdownstagingを認めた。照射前にnon-diploidであった11例では、4例(36%)にdownstagingを認めた。

## 5、照射前後における ploidy の変化

照射前後における ploidy の比較は、25例で可能であった。照射前 diploid であった症例は17例で、内10例(59%)が照射後も、変化なく、7例(41%)が照射後、non-diploid に変化していた。照射前 non-diploid であった8例では、照射後にも変化なかったものと、照射後に diploid に変化していたものが、4例ずつであった。

downstaging との関連で見ると、diploid → diploid では10%(1/10)に、diploid → non-diploid では57%(4/7)に、non-diploid → non-diploid では0%(0/4)に、non-diploid → diploid では25%(1/4)に、それぞれ downstaging が見られた。

## 6、リンパ節転移所見と DNA ploidy

膀胱全摘時のリンパ節転移の状態と、膀胱組織の ploidy の、両者が明らかとなった症例は、40例であった。pN0 30例では、14例(47%)が non-diploid であった。pN1 では100%(2

/2)、 $pN \geq 2$  では 50%(4/8)、 $pN(+)$  全体では 60%(6/10) が non-diploid であった。

#### 7、予後と DNA ploidy

全摘標本における DNA ploidy を解析できた症例の中で、3年以上の癌なし生存を12例で(38~115か月、平均69か月)、また癌死を11例で(3~51か月、平均6か月)確認できた。その結果、3年以上生存症例での non-diploid の比率は 67%(8/12)、癌死11例での non-diploid の比率は 64%(7/11) であった。

## 考 案

### 1、異型度とDNA ploidy (結果の1)

膀胱全摘術を施行した症例のみの分析であるため、G1症例の数が少なく、各異型度間での正確な比較は困難であるが、異型度の上昇につれて non-diploid の比率が増加する傾向は認められた。但し、それほど大きな差ではなく、同じG1でも膀胱全摘に至るような多発性あるいは再発性の症例では、異型度の高い症例に匹敵するようなDNA ploidy上の異常が現れているとも考えられる。

### 2、深達度とDNA ploidy (結果の2、3)

DNA ploidyと臨床的深達度(照射の影響のないサンプルでの検討)、及び病理学的深達度のいずれの比較においても、一定の関連は見られなかった。このことから、深達度とDNA ploidyとは独立した因子であると考えられた。すなわち、DNA ploidyの異常は、癌の浸潤を促進する因子ではないと思われる。

### 3、リンパ転移とDNA ploidy (結果の6)

pNの上昇に比例した、明らかなDNA ploidyの異常の増加は見られず、DNA ploidyはリンパ節転移の程度を示す因子とはなり得ないと考えられた。

### 4、照射とDNA ploidy (結果の4、5)

DNA ploidyと放射線照射への反応の有無 (downstagingの有無)には明らかな関連は見られなかった。また、照射によるploidyの変化の仕方にも、一定の傾向は認められなかった。ただ、照射前にdiploidで、照射後non-diploidに変化していた症例では、他の症例に比し、downstagingの率が高かった。このことは、照射による異常な核DNAを持った細胞の出現が、腫瘍の退縮と関連していることを示唆するものかも知れない。

### 5、予後とDNA ploidy (結果の7)

長期生存例と癌死例との比較検討では、DNA ploidyと予後との間には関連性は見られなかった。すなわちDNA ploidyは、予後を規

定する因子とはなっていないと考えられた。

当科における膀胱全摘症例68例の検討では深達度とリンパ節転移所見が最も密接に予後と関連しており（ $pT \geq 3b$ ,  $pN \geq 2$ の症例の予後が、他の群に比し有意に悪い）、これら2因子との相関が見い出されなかった。DNA ploidyは、やはり予後との関連は希薄であった。このことより、non-diploidであることは、浸潤、転移という癌の悪性度とは直接関連するものではないと言いうことが出来ると思われる。non-diploidであることの一部が、あるいは、FCMでは見い出されないような、より微小なDNAの変異が、真の意味の悪性度を規定しているのではないかと思われる。