



## CYTOPHOTOMETRIC AND FLOW CYTOMETRIC DNA CONTENT OF ISOLATED GLANDS IN GASTRIC NEOPLASIA

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北山, 康彦 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1006">http://hdl.handle.net/10271/1006</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 153号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏名	北山康彦		
論文題目	CYTOPHOTOMETRIC AND FLOW CYTOMETRIC DNA CONTENT OF ISOLATED GLANDS IN GASTRIC NEOPLASIA (胃粘膜病変部単離腺管の蛍光顕微測光法、及びフローサイトメトリーによる DNA の定量)		

医学博士 北山康彦

論文題目

CYTOPHOTOMETRIC AND FLOW CYTOMETRIC DNA CONTENT OF ISOLATED GLANDS IN GASTRIC NEOPLASIA

(胃粘膜病変部単離腺管の蛍光顕微測光法、及びフローサイトメトリーによる DNA の定量)

論文の内容の要旨

目的:

消化器癌の DNA の定量には、多くの場合ホルマリン固定パラフィン包埋組織が使われている。この従来の方法では間質細胞の混入が避けられず、また核破碎や DNA の変性によって正確な測定が困難である。われわれは、ほぼ純粋に上皮細胞だけ取り出すことが可能な腺管分離法によって、胃粘膜病変部、正常部の上皮腺管を採取し、それらの立体構造を観察すると共に蛍光顕微測光法及びフローサイトメトリーによって、より正確に核 DNA 量を測定した。

〔材料〕新鮮胃手術摘出材料あるいは生検で得られた胃癌24例、腺腫4例、過形成ポリープ5例、腸上皮化生6例で検索した(胃癌は男性15例、女性9例、平均年齢66.3歳)。内部コントロールには背景の正常粘膜上皮を用いた。

〔方法〕採取された組織は直ちに4℃の Ca-Mg free Hanks 液 (CMFH) で洗浄し、2~3 mm に細切、30mM の ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) 入り Hanks 液に入れ37℃の恒温槽中でインキュベーションした。次に Hanks 液に戻し攪拌によって浮遊してきた多量の腺管を回収した。固定後各上皮腺管の形態を実体顕微鏡及び走査電子顕微鏡下で観察した。また、アルシアンブルーによる腺管染色で全長に goblet cell を認める腸上皮生腺管を分別した。分離後の粘膜及び分離腺管の組織切片で各組織型を確認した。

採取した腺管組織は0.025-0.0125%のペプシン (pH1.5) で酵素処理し裸核化した後4', 6-diamino 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で染色し蛍光顕微鏡測光法 (CPM) で核 DNA 量を測定した。同様に、細胞裸核浮遊液を RNase で処理し propidium iodide (PI) で蛍光染色してフローサイトメトリー (FCM) で DNA ヒストグラムを解析したこの際、病変部と正常のコントロール細胞との混合比を替えて検討した。

〔結果〕正常腺管は長さ約500-1000 $\mu$ m の管状胞状あるいは不分枝管状構造をとり、癌はその組織型によって不規則な分枝と多様な大きさを有していた。いずれも基底膜から上皮成分のみ分離できた。DAPI 染色像は、腺腫では正常核より小さい紡錘形を、癌細胞核は正常の約1.5-2倍で大小不同があり蛍光強度も数倍に及ぶものがあつた。

CPM による解析では、DNA index (DI) により diploidy (DI<1.10) 10例、aneuploidy (DI $\geq$ 1.10) は14例 (58.5%) で組織学的 grading では、高分化癌 (33.3%) に対し中分化癌 (81.8%) で有為が高率であつた ( $\chi^2$  test=0.0192)。typing 分類では有為差はなかつた。aneuploidy は更に mosaic ploidy (MP:1.10 $\leq$ DI $\leq$ 1.9、8例)、higher polyploidy (HP:DI<1.9、6例) に分類された。

FCM によるヒストグラム解析では、CPM で diploidy であつた10例中4例に near diploid (ND: 1.01<DI<1.10)、3例に MP が検出できた。全体で87.5%と aneuploid が高率で、特に高分化型の癌で高かつた。また、腸上皮化生の一例に hypo near diploid (DI=0.97) があつた。coefficient of

variance (CV) 値は平均3.12であった。

〔考察〕 癌関連遺伝子解析の際、機械的に組織を採取する方法では間質細胞の混入が生じ純粋に目的とする細胞のみを検索することは難しい。われわれは今回初めて胃粘膜を用いて上皮腺管を採取し正確な病変部核 DNA 量を測定した。CPM による DNA の解析では、パラフィンや凍結材料を使った方法より高率に aneuploid が認められたのは間質細胞の混入によって mask されていた small aneuploid peak (SAP) を検出できた為と思われる。また癌では多倍体や異数倍体細胞の存在が特徴でこの増殖活性の強さが癌細胞の grading を反映していると思われる。FCM ではより分化度の高い癌で SAP や ND を明らかにできたが、これは癌化の初期の遺伝子異常や悪性度の低い状態を捉えている可能性がある。

胃粘膜病変部における純粋な腫瘍細胞の DNA 量を測定した報告はなく、今後このような方法で前癌病変や微小病変の解析が可能になるものと思われる。

### 論文審査の結果の要旨

消化器癌の DNA の定量は、一般には切除標本あるいは生検材料等のホルマリン包埋組織が用いられている。この方法では間質細胞の混入が避けられず、同時に核破砕や DNA の変性等により正確な測定が困難であった。申請者らは Cheng らの開発した大腸の腺管分離法に改良を加え、胃粘膜組織の腺管を形態を保ったままほぼ純粋に取り出すことに成功した。それによって得られた健常あるいは腫瘍腺管などを用い、それらの立体構造を明かにし、さらに蛍光顕微測光法およびフローサイトメトリーによって、より精度の高い核 DNA 量を測定した。

対象は、新鮮胃手術摘出材料（腺腫については一部生検材料）、胃癌24例、腺腫4例、過形成性ポリープ5例、腸上皮化生6例で、内部コントロールにはそれぞれの背景健常粘膜を用いた。これらを30mMのEDTA入りHanks液、Ca-Mg free Hanks液などで処理し、基底膜を含まないほぼ純粋な腺管を得た。腺管はペプシン処理により裸核とし、蛍光顕微測光法にはDAPI染色を、またフローサイトメトリーにはPI染色を行い核DNAの解析を行った。

結果を要約すると

1. 本法で得られた腺管を実体顕微鏡、または走査電顕で検討し、各々の病変は特有な形態を有することが明かとなった。すなわち、健常幽門腺は管状胞状構造を、胃底腺は分枝～不分枝構造を、また癌はその組織型によって不規則な分枝と多様な大きさを有していた。
2. 核は、腺腫では正常核よりも小さい紡錘形を、癌細胞核は正常の1.5～2倍で大小不同があり、蛍光強度も数倍に及ぶものがあった。
3. フローサイトメトリー解析では、正常腺管、腺腫で aneuploidy を示したものはなかった。癌では diploidy (DNA index < 1.10) 10例、aneuploidy (DNA index ≥ 1.10) 14例であった。aneuploidy の頻度は、組織型では差がなかったが、組織学的 grading では、高分化癌 (33.3%) と較べ中分化癌 (81.8%) で有意に高率だった。しかし癌の進行度と ploidy pattern との間には相関がなかった。
4. 蛍光顕微測光法により diploidy とされた10例中、フローサイトメトリーにより4例が near diploidy (1.01 < DNA index < 1.10)、3例が aneuploidy と判定されフローサイトメトリーでより精度が高かった。

本研究は、従来法の欠点を大幅に改善したものと評価できる。とくに腺管をその構造を保ちながらほ

ば純粋な形で分離可能であること、それにより各種病変腺管の立体構造を明らかにし得ることは、今後他方面への応用も考えられ意義あるものと判断される。またこのようにして取り出された腺管を用いての DNA 解析は従来法より精度が高く、組織型、深達度などと ploidy pattern との関連における既報の結果と異なるものであり注目される。

なお、この論文審査の過程において論文内容の以下のような質疑応答があった。

1. 腺管分離法の改良点はどこか
2. 採取された腺管の viability はどうか
3. 癌組織内への健常細胞の混入はどの程度か
4. 最近用いられている蛍光色素の特徴と使用方法
5. 生検材料でも腺管分離が可能か
6. 癌組織型、深達度などと ploidy pattern が既報の結果と異なるのはなぜか
7. 同一癌組織内の ploidy pattern の heterogeneity について
8. 腺腫において  $2n$  のピークの幅が広いのはなぜか
9. ploidy pattern から腺腫の良悪性の鑑別が可能か
10. 腸上皮化生で S 期 DNA の低下する理由

以上の質問に対する申請者の応答はおおむね的確であり、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えているものと、全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 金子 榮 藏

副査 教授 寺 尾 俊 彦 副査 教授 寺 川 進

副査 教授 原 田 幸 雄 副査 助教授 小 出 幸 夫