

肺癌手術の術前化学療法におけるFas抗原発現とアポ
トーシス発現に関する免疫組織化学的研究 CAS
200による解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9231

肺癌手術の術前化学療法における Fas 抗原発現と アポトーシス発現に関する免疫組織化学的研究

—CAS 200 による解析—

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

疋 島 一 徳

肺癌手術の術前化学療法によって、細胞死のシグナルの受容体である Fas 抗原が、癌細胞で誘導されているかどうかを検討し、同時にその Fas 抗原発現が、肺癌化学療法の抗腫瘍効果の指標および予後判定因子となりうるかどうかについて検討した。対象は、局所の術前化学療法である気管支動脈内薬剤注入療法 (bronchial arterial infusion therapy, BAI) 群108例、術前全身化学療法 (induction therapy, IT) 群40例、および術前無治療群67例の計215例であった。抗 Fas モノクローナル抗体を用いて術前化学療法後の肺癌組織を免疫組織化学染色し、Fas 抗原発現とその分布、そして、アポトーシス発現について臨床病理学的に各群を比較検討した。Fas 抗原発現の判定には、その抗原の免疫染色の強度を定量的に検索できる画像解析装置 (cell analysis systems, CAS) 200 を用いた。抗原の細胞質平均発色強度 (cytoplasm average optical density, CYTOAD) を本装置を用いて定量的に測定し、解析した。Fas 抗原発現率は術前無治療群で31例 (46.3%) であったのに対し、BAI 群61例 (61.1%)、IT 群28例 (70.0%) と、術前化学療法群が有意に高率であった ($p < 0.05$)。Fas 抗原の CYTOAD は、術前無治療群 0.259 ± 0.051 、BAI 群 0.280 ± 0.059 、IT 群 0.300 ± 0.052 と、有意に術前化学療法群で高値を示した ($p < 0.01$)。BAI 群においては、制癌剤の投与薬剤数に比例して Fas 抗原発現率が高くなる傾向を示した。CYTOAD でも、1剤群 0.251 ± 0.042 、2剤(および3剤)群 0.296 ± 0.056 、4剤群 0.304 ± 0.073 と、多剤併用群で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。IT 群では、投与回数に比例して Fas 抗原発現率が高率となり、CYTOAD が高値となる傾向を認めたが、有意差はなかった。術前化学療法群 (BAI 群と IT 群) の Fas 抗原陽性例の生存率は陰性例より有意に予後が良好であった ($p < 0.01$)。組織型別では、BAI 群の扁平上皮癌の Fas 抗原陽性例の生存率は陰性例に比べて有意に予後が良好であった ($p < 0.05$)。その他の組織型では Fas 抗原陽性例と陰性例の生存率に有意差はなかった。IT 群の組織型別では、生存率に有意差はなかった。病期別では、BAI 群、IT 群ともに Fas 抗原陽性例と陰性例の生存率にともに有意差はなかった。BAI 群のリンパ節転移陽性の Fas 抗原陽性例は、陰性例と比べると有意に予後が良好であった ($p < 0.05$)。IT 群リンパ節転移陽性の Fas 抗原陽性例は生存率に有意差はなかったが、予後良好の傾向を認めた。N2 非小細胞肺癌の IT による病期改善 (down stage) の8例は、病期不変の24例と比べて有意に予後が良好であり ($p < 0.05$)、Fas 抗原発現率も 87.5% と高値を示した。BAI 群と IT 群の免疫組織化学染色像と HE 染色像で、腫瘍の壊死巣とその周辺に Fas 抗原陽性の変性した癌細胞が多数みられ、核の断片化や球状小体化 (apoptotic body) のアポトーシス像が認められた。以上の結果から、制癌剤投与によって、癌細胞に細胞死のシグナルの受容体である Fas 抗原が発現し、腫瘍の一部にはアポトーシスが誘導されたと推察された。したがって、切除材料における Fas 抗原発現の検索は肺癌の術前化学療法の効果判定の良い指標となると思われる。

Key words apoptosis, Fas antigen, lung cancer, induction therapy, immunohistochemical staining

近年増加傾向にある原発性肺癌は、完全切除例であってもその再発率が高く、予後不良の疾患である。肺癌は、たとえ発見時小径でも、高率に遠隔臓器 (肺、脳、骨など) に微小転移巣がみられ、これが肺癌手術の予後を大きく左右する要因の一つとなっている¹⁾²⁾。肺癌手術の予後を改善するために、腫瘍の血管系が破壊されていない術前に化学療法を行って微小転移巣を制御すると同時に、原発巣の縮小を計り、手術操作による癌細胞の散布を予防し、肺癌術後の再発率を低下させることを目的と

した術前化学療法 (induction therapy, IT) に期待がかけられている。

一方、増殖細胞核因子 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) や p53 などの、腫瘍増殖能や遺伝子変異が肺癌の予後因子に深く関わっていることが明らかになっている³⁾。また細胞外からアポトーシスを誘導する細胞死機構 (Fas 抗原そして Fas リガンド) に関する研究から⁴⁾⁵⁾、制癌剤や放射線による細胞傷害にアポトーシスが関与することが判明し、癌細胞での化

平成 8 年 6 月 26 日 受付, 平成 8 年 8 月 30 日 受理

Abbreviations: ABC, avidin-biotinylated peroxidase complex; BAI, bronchial arterial infusion therapy; CAS, cell analysis system; CDDP, cis-diamminedichloroplatinum; CT, computed tomography; CTL, cytotoxic T lymphocyte; CYTOAD, cytoplasm average optical density; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; IT,

学療法や放射線療法でのアポトーシス出現が注目されている。

本研究では、肺癌手術の術前化学療法により、細胞死のシグナルの受容体である Fas 抗原が癌細胞で誘導されているのかを検討し、さらに、Fas 抗原発現が肺癌化学療法の抗腫瘍効果の指標、そして予後因子となりうるかを免疫組織化学的手法を用い、臨床病理学的に比較検討した。

さらに、従来の光学顕微鏡(光顕)での観察では、免疫組織化学染色の陰性、陽性および発色強度の判定に観察者の主観が入る問題点があったが、抗原の免疫染色の強度を定量的に検索可能な画像解析装置 (cell analysis systems, CAS) 200 を用い⁶⁾、抗原の発色強度を客観的に評価した。

対象および方法

I. 対 象

1975年1月から1994年12月までの20年間に金沢大学医学部第一外科学教室で切除された原発性肺癌のうち、術死および他病死を除き、予後の評価可能であった215例を対象とした。外科治療のみの術前無治療症例67例、術前気管支動脈内薬剤注入療法 (bronchial arterial infusion, BAI) を施行した108例、および IT を施行した40例の3治療群に分けて検討した。

これら3群の臨床的背景因子を表1に示した。性別では、男性174例、女性41例であり、年齢別では、16~86才、平均61.2±9.7才で、60才以下の若年者95例、61才以上の高齢者120例であった。病理組織型分類では、腺癌83例、扁平上皮癌106例、大細胞癌15例、小細胞癌11例であった。病期分類では、I期53例、II期21例、III A期74例、III B期38例、IV期29例であった(組

織分類、病期分類は肺癌取り扱い規約第4版⁷⁾に従った)。術前無治療群および BAI 群の病期は病理学的分類 (pathological-TNM, pTNM) を用い、IT 群では化学療法前の臨床的分類 (cTNM) と pTNM について検討した(表1)。

IT は主に N2 非小細胞癌に対して施行した。質的診断は組織診、細胞診で確定診断を行い、画像診断には胸部X線像およびコンピューター断層撮影 (computed tomography, CT) にて行った。明らかに縦隔リンパ節腫大を認めた N2 例(CTにて短径1cm以上2レベル、1レベルなら短径1.5cm)に対しては縦隔鏡にて転移陽性か否かを診断した。

II. 方 法

1. Fas 抗原に対する免疫組織化学染色法

切除標本はパラフィン包埋され保存されているものを使用した。パラフィン包埋ブロックは腫瘍の中心部とその辺縁部を選択した。転移性リンパ節の選択は、IT 群の HE 染色で転移の有無を確認した標本を用いた。パラフィン包埋された肺癌組織または転移性リンパ節を 4μm の厚さに薄切し、この切片を 0.02% ポリ-L-リジン (poly-L-lysine) を塗布したスライドに付着させ、100% キンレン (和光, 大阪) で5分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%, 90%, 80%, 70% のエチルアルコール (和光) にて各5分間脱水し、リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.2) で5分間洗浄した。その後15分間室温にて 0.3% 過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを阻害した。つぎに、5ml の PBS に正常ヤギ血清 (MBL, 名古屋) 2滴を加え、よく攪拌しブロッキング液を作成し、20分間ブロッキングし、PBS で5分間洗浄した。

Table 1. Correlation between clinicopathological factors and each therapeutic group

Clinicopathological factors	No. of patients	No. of patients with		
		Surgery alone	BAI	IT
Sex				
Male	174	48	92	34
Female	41	19	16	6
Age (yrs)				
≤60	95	22	56	17
≥61	120	45	52	23
Histology				
Adenoca.	83	30	39	14
Epidermoid ca.	106	27	62	17
Large cell ca.	15	8	5	2
Small cell ca.	11	2	2	7
Stage ^{a)}				
I	53	25	25	3
II	21	10	11	0
III A	74	10	43	21
III B	38	12	15	11
IV	29	10	14	5

BAI, bronchial arterial infusion therapy; IT, induction therapy; adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma; large cell ca., large cell carcinoma; small cell ca., small cell carcinoma.

a) Stages of surgery alone and BAI groups were classified postoperatively according to the general rule for clinical and pathological record of lung cancer (the Japan Lung Cancer Society), and Stage of IT group was classified before IT.

induction therapy; MMC, mitomycin C; PBS, phosphate-buffered saline; pTNM, pathological TNM; TNF, tumor necrosis factor; 3生率, 3年生存率; 5生率, 5年生存率; 10生率, 10年生存率; 光顕, 光学顕微鏡

一次抗体は抗 Fas モノクローナル抗体 (clone UB2, IgG, 1mg/ml, 100 μ l/バイアル) (MBL) を用い、PBS で50倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。続いて、PBS にて5分間、3回洗浄後、二次抗体 [5ml の PBS に正常ヤギ血清 (MBL) 2滴を加えよく攪拌し、さらにビオチン標識抗マウス IgG 抗体 (MBL) 2滴を加え攪拌し二次抗体溶液を作成した] を用いて、室温にて20分間反応させた。PBS にて5分間、3回洗浄後、アビジン-ビオチン化ペルオキシターゼ複合体 (avidin-biotinylated

peroxidase complex, ABC) 溶液 [5ml の PBS にビオチン標識ペルオキシターゼおよびアビジン (MBL) をそれぞれ2滴ずつ加え、よく攪拌し、室温で30分間静置し作成した] を用いて室温にて20分間反応させた。PBS にて5分間、3回洗浄後、四塩酸 3,3'-ジアミノベンジン・4HCl (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB・4HCl) (MBL) で拡大ルーペで発色状態を確認しながら約5分間から10分間室温にて反応発色させ、蒸留水でよく水洗した。マイヤー・ヘマトキシリン液 (金沢大学医学部付属病院中央検査部病理部作成) にて約15秒間反応させ核染色を行った。最後に70%, 80%, 90%, 100% エチルアルコールで脱水し、100% キシレンにより、5分間、3回の透徹を行った。

3. Fas 抗原発現の検出

免疫染色された切片に水溶性封入剤を滴下し、カバーガラスで固定し、一部正常肺組織そして腫瘍辺縁部から中心部を光顕で観察した。Fas 抗原発現例において、癌細胞質内の褐色顆粒または癌細胞膜に接し褐色に DAB で染色された細胞質を観察できた。免疫染色陰性例は再度免疫染色し、DAB に対して不染色であることを確認した。Fas 抗原陽性でアポトーシスに陥った細胞の判定は同一標本を HE 染色し、光顕にて再度確認した。

4. CAS 200 による免疫組織化学染色の客観的評価

CAS 200 (Becton-Dickinson, New Jersey, U.S.A.) は、光顕の病理標本の画像をコンピューターに取り込み、画像処理し、細胞核や細胞質を自動認識して分析に必要な定量的データを取り出す画像解析装置である。今回、著者が使用したプログラムは細胞計測プログラム (cell measurement program) の中から、細胞質抗原の免疫染色の分析に使用する2波長同時閾値測定 (object with dual threshold two wavelengths) を選んだ⁹⁾。抗 Fas モノクローナル抗体を使った免疫組織化学染色の発色強度は OD として測定し、客観的な指標とした。DAB で発色させた細胞質抗原の OD は 500nm の波長で測定し、そしてマイヤー・ヘマトキシリンによって染色された核は 620nm の波長で検討する2色 (2波長) 測光システム (two-color system) で行った⁹⁾ (図1)。免疫染色の細胞質抗原の DAB の平均発色強度 (cytoplasm average optical density, CYTOAD) を測定する時、発色強度の0点をどこにとるかで、値が不安定になる。つまり、一次抗体である抗 Fas モノクローナル抗体を加えない陰性対照 (negative control) や明らかに染まっていない部の発色強度を0点としても、DAB で発色した背景がある場合、OD 測定

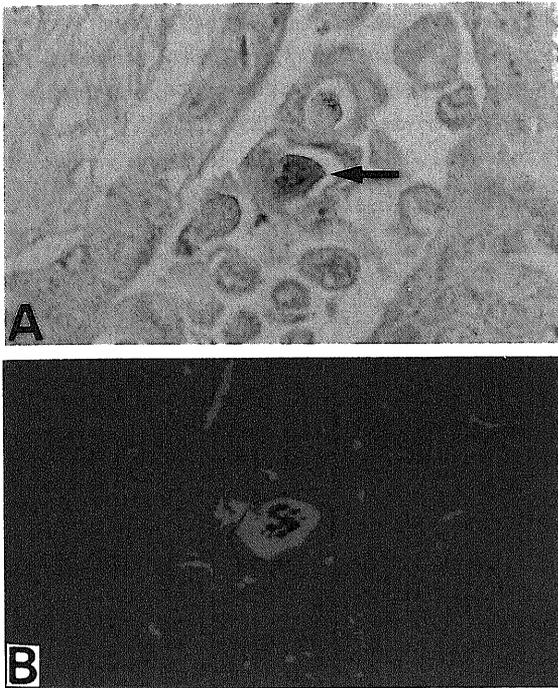


Fig. 1. Analysis of images of immunohistochemical staining using two-color system of CAS 200. (A) Fallen into lumen of cancer cell lesions, fragmentation of nuclei was noted, while cell membranes were well preserved. Fas antigen-positive cells having cytoplasm densely immunostained with DAB by anti-Fas monoclonal antibody were noted (arrow). (B) Of the cell measurement program of CAS 200, "object with dual threshold two wavelengths" for analysis of immunostaining of cytoplasm antigen was selected, and the image was processed by two-color system. Compared with the same cell in light microscopic image ($\times 400$), CYTOAD of Fas antigen within the range enclosed by red lines was determined.

Table 2. Infused drugs selected for histological classification of lung cancer in each period

Histology	Before 1975	1975~1982	Since 1983
	Single drug	Two drug and Three drug	Three drug plus OK432
Epidermoid ca.	CQ	CQ+MMC (+ACNU)	ACNU+CQ+MMC+OK432
Adenoca. and small cell ca.	MMC	ADM+MMC (+ACNU)	ACNU+ADM+MMC+OK432
Large cell ca.	MMC	ADM+CQ (+ACNU)	ACNU+ADM+CQ+OK432

Epidermoid ca., epidermoid carcinoma; adenoca., adenocarcinoma; small cell ca., small cell carcinoma; large cell ca., large cell carcinoma; CQ, carboquone; MMC, mitomycin C; ADM, doxorubicin; ACNU, nimustine.

に、ばらつきがあり、判定基準の0点は1視野で決定することは困難である。このため定量データの客観性を計るため、陰性対照と基準陰性細胞の計76個の Fas 抗原の CYTOAD を測定し、0点の CYTOAD のカット・オフ値を0.200と定めた¹⁰⁾。したがって癌細胞の Fas 抗原陽性の有無の判定は、CYTOAD 0.200 未満を Fas 抗原陰性、CYTOAD 0.200 以上を Fas 抗原陽性と判断した。Fas 抗原陽性のプレパラートの CYTOAD は、Fas 抗原陽性細胞10個~15個の各々の CYTOAD を測定し、その平均値を求めた (図 2A, B)。

5. BAI の方法と注入薬剤の選択

局所麻酔下に、大腿動脈から Seldinger 法¹¹⁾にて経皮的にカテーテルを挿入し、透視下で気管支動脈に楔入して、試験的に1~2mlの血管造影剤を注入して病巣の栄養血管であることを

確認した。その後、20mlの生理的食塩水に希釈した制癌剤を約10分間かけてゆっくり注入する。BAI終了後再び、造影剤1~2mlを注入して、気管支動脈内にカテーテル先端が固定していたことを確認した¹²⁾。BAIの注入薬剤は組織型別に制癌剤の種類を選択し、各年代別に薬剤を変更して併用した。すなわち1975年には1剤、75年から82年の間は2剤(および3剤)、83年からは、3剤にOK432(中外製薬、東京)を併用する4剤とした¹³⁾(表2)。

6. IT の投与薬剤

ITの投与薬剤は、ⅢA期に対しては、シスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum, CDDP)(プリストル・マイヤーズ スクイブ、東京)80mg/m²、ビンデシン(vindesine, VDS)(塩野義、大阪)3mg/m²、マイトマイシン(mitomycin C,

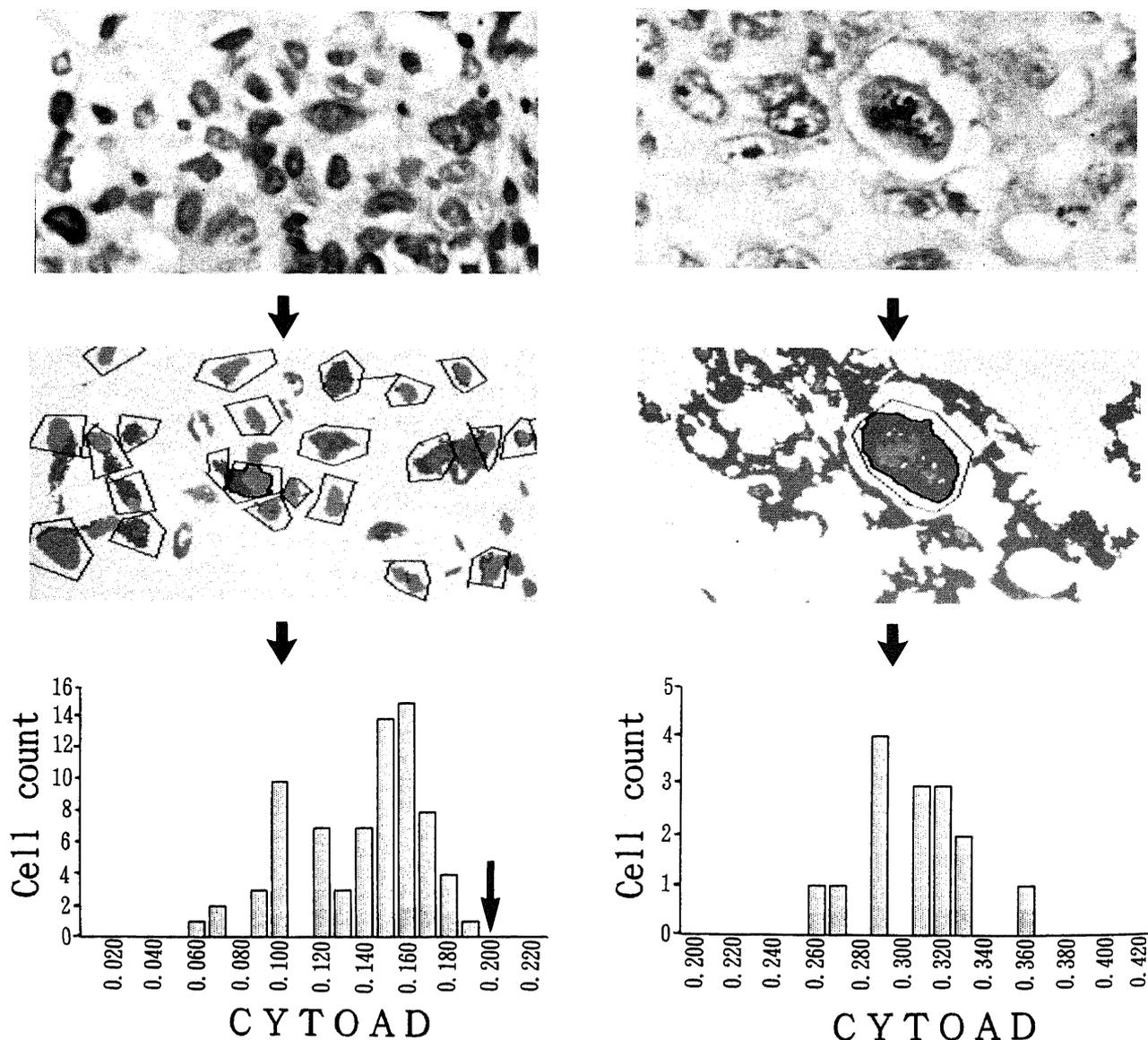


Fig. 2. Histogram of CYTOAD of negative control and Fas antigen-positive preparation. (A) To increase objective accuracy of quantitative data, CYTOAD of Fas antigen was determined in negative control and standard reference negative cells (76 cells in all), and the cut off point was defined as 0.200 (arrow). To determine presence or absence of Fas antigen-positive cancer cells, CYTOAD of less than 0.200 was regarded as negative, and CYTOAD of 0.200 or more was regarded as positive. (B) Average value of CYTOAD of Fas antigen-positive preparation was determined by cell count of 10 to 15 Fas antigen-positive cells and by determining CYTOAD of each cell.

MMC (協和発酵, 東京) 8mg/m² の多剤併用療法⁽⁴¹⁾ を施行した。Ⅲ B 期に対しては CDDP 60mg/m², 5FU (5 fluorouracil, 5FU) (協和発酵) 800mg/m², エトポシド (etoposide, VP16) (ブリistol・マイヤーズ スクイブ) 60mg/m² と放射線療法 (総量 45Gy) を併用する化学療法と同時放射線療法 (concurrent 法⁽⁴²⁾) をおこなった (表 3)。

Ⅲ. 統計学的処理

Fas 抗原発現率は百分率 (%) で表し, Fas 抗原陽性例と Fas 抗原陰性例との 2 群の比率の差の検定は χ^2 検定を用いた。また CAS 200 で得られた CYTOAD は平均値 ± 標準偏差 (SD) で示し, 平均値の有意差検定に, 2 群間では Mann-Whitney U 検定を用い, 3 群間以上では Kruskal-Wallis 検定を用いた。分散解析で検定を行って有意差が認められた場合, 各組み合わせについての多重比較検討である Fisher の最小有意差法 (Fisher's least significant difference, Fisher's LSD) で検定した。生存率の算定は Kaplan-Meier 法を使用し, その有意差検定は Cox-Mantel 法を用いた。いずれも p 値が 0.05 以下を有意差ありと判定した。

成 績

I. Fas 抗原に対する免疫組織化学染色

1. 正常肺組織の光顕像

腫瘍周囲の正常肺組織においては, 肺胞組織は Fas 抗原陰性

であったが, 気管支腺において一部の腺管は Fas 抗原陽性を示した。また同一腺管内でも陰性を示す細胞と陽性を示す細胞が混在していた。Fas 抗原陽性を示す気管支腺細胞をよく観察すると, 核の形状は不安定な円形で, 核の位置も基底膜からはずれ, まばらな配置であった (図 3)。

2. 肺癌組織の光顕像

1) 術前無治療群の肺癌組織像

術前無治療群のうち, Fas 抗原陽性を示した例を示す。扁平上皮癌では, 癌巣の中央の一部に, 核がやや縮小し細胞質が褐色に染色された Fas 抗原陽性所見を認めた (図 4A)。高分化型腺癌では, 核の周縁のゴルジ装置近くの形質内に褐色顆粒をもつ Fas 抗原陽性所見を認め, その核は比較的安定していた (図 4B)。

2) BAI 群の肺癌組織像

図 5A は BAI 4 剤施行後 15 日目に手術した症例である。扁平上皮癌の癌巣内に散在し, 核も細胞の大きさも縮小し, アポトーシスに陥った Fas 陽性細胞を認めた。図 5B は BAI 3 剤施行後 7 日目に手術した症例である。腫瘍壊死巣周辺に Fas 抗原陽性細胞が認められ, その癌巣内にアポトーシスに陥った細胞が認められた。壊死巣は Fas 抗原陰性であり, 壊死とアポトーシスの差異をよく表していた。

Table 3. Treatment regimen of IT in each period

Year	Stage	Treatment regimen
1988~1993	Ⅲ and Ⅳ	CDDP+VDS+MMC
1994~	Ⅲ A	CDDP+VDS+MMC
	Ⅲ B	CDDP+5FU+VP16+RT

Carcinostatics : CDDP, cisplatin ; VDS, vindesine ; MMC, mitomycin C ; 5FU, 5-fluorouracil ; VP16, etoposide. RT, radiation therapy.

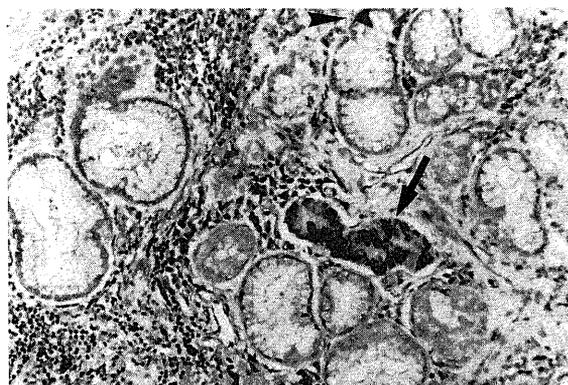


Fig. 3. Light microscopic images of immunohistochemical staining of normal lung tissues. In bronchial glands, some of the gland ducts were Fas antigen-positive (arrow). When Fas antigen-positive cells of bronchial glands were examined in detail, the nucleus was in unstable circular shape, and nucleus was deviated from basement membrane and was distributed sparsely. Even in the same gland duct, negative cells and positive cells were present at the same time (arrowhead) (×400).

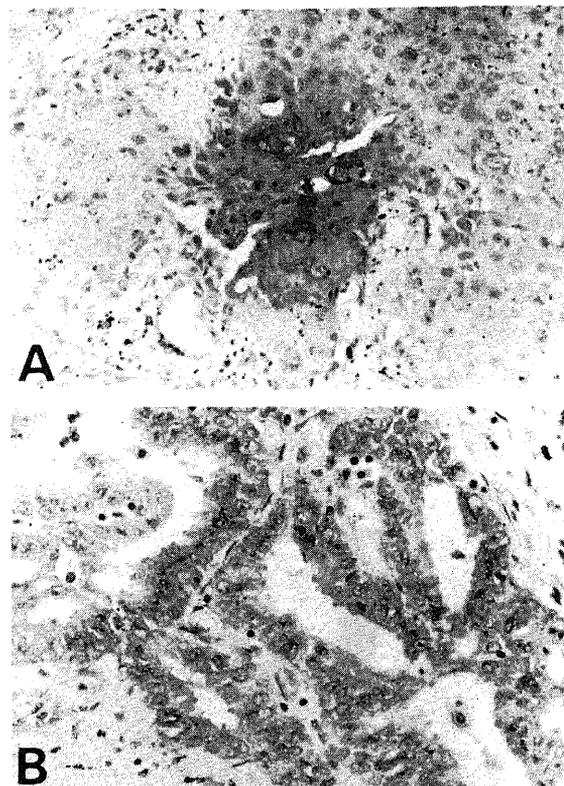


Fig. 4. Light microscopic images of immunohistochemical staining of lung cancer tissues in surgery alone group. (A) In squamous cell carcinoma, Fas antigen-positive cells having nucleus slightly reduced and cytoplasm stained in brown were noted partly at the center of cancer cell lesion (×400). (B) In well differentiated adenocarcinoma, Fas antigen-positive cells having brown granules in cytoplasm near Golgi apparatus on the edge of nucleus were found. The nucleus was relatively stable (×400).

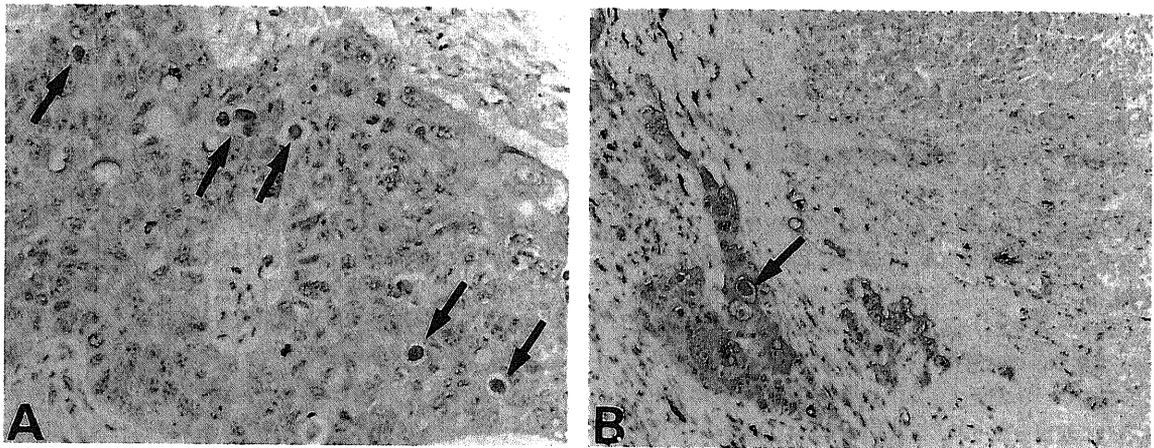


Fig. 5. Light microscopic images of immunohistochemical staining of lung cancer tissue in BAI group. (A) Fas antigen-positive cells (CYTOAD 0.325) were scattered in cancer cell lesions of squamous cell carcinoma. The nucleus and cell size were both reduced and cells were in apoptosis (arrow) ($\times 200$). (B) Fas antigen-positive cells were noted in necrotic lesion of tumor, and the cells in apoptosis (CYTOAD 0.365) were found in the cancer cell lesion (arrow). The necrotic lesion at the right side was Fas antigen-negative (CYTOAD 0.121) ($\times 200$).

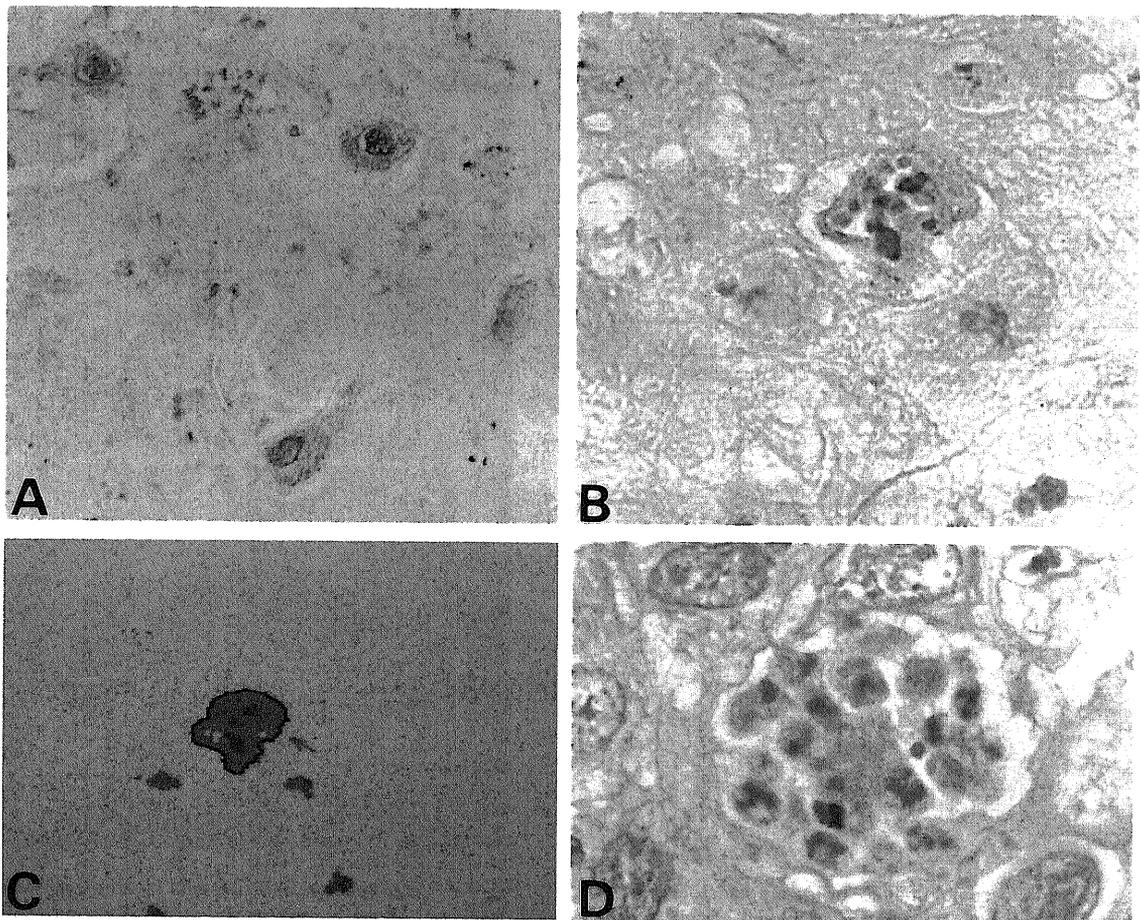


Fig. 6. Light microscopic images of immunohistochemical staining of lung cancer tissue in IT group. (A) Degenerated Fas antigen-positive cancer cells (CYTOAD 0.265 to 0.297) were scattered in necrotic lesion of squamous cell carcinoma. The nucleus showed a trend to reduction, but membrane was maintained ($\times 400$). (B) Among Fas antigen-positive cells in metastatic lymph nodes, there were some, in which fragmentation of nucleus proceeded further ($\times 1000$). (C) In the image analysis CYTOAD of Fas antigen was high as 0.321. (D) When observed with HE staining, breakage and fragmentation of nuclei in the same cancer cell advanced, showing the process toward apoptotic body, which is the final image of apoptosis ($\times 1000$).

3) IT 群の肺癌組織像および転移性リンパ節組織像

CDDP+VDS+MMC の IT 2 コース終了後手術した症例を示す。扁平上皮癌で、腫瘍の壊死巣に Fas 抗原陽性の変性した癌細胞が散見され、その核は縮小傾向を示したが細胞膜は保たれていた (図 6A)。転移性リンパ節の腫瘍壊死巣の Fas 抗原陽性細胞の中には、核の分断化がさらに進んだものが認められた (図 6B, C)。HE 染色では同細胞の核の凝縮、断片化が高度になり、アポトーシスの最終像である球状小体化 (apoptotic body) への過程が認められた (図 6D)。

II. Fas 抗原発現率の CYTOAD による解析

1. 術前無治療群における Fas 抗原発現率の CYTOAD による解析

Fas 抗原発現率は、性別では男性 50.0%、女性 36.8% と男性に高く、年齢別では60才以下の若年者に有意に高率であった (p<0.05)。組織型別では差はなかった。病期別では I 期 36.0%、II 期 30.0%、III A 期 50.0%、III B 期 58.3%、IV 期

70.0% と、病期が進行するにつれ、Fas 抗原発現率が高くなる傾向を認めたが、有意差はなかった。TNM 分類別では、T1; 40.9%、T2; 43.5%、T3; 53.8%、T4; 55.6% と T 因子の増加に伴い、Fas 抗原発現率が高くなる傾向を認めた。N 因子別では N0; 40.6%、N1~3; 51.4% とリンパ節転移陽性例が、また M 因子別では M0; 41.1%、M1; 72.9% と遠隔転移陽性例で Fas 抗原発現率が高かったが、有意差はなかった。CYTOAD による解析では各因子間にいずれも有意差は認められなかった (表 4)。

2. BAI 群における Fas 抗原発現率の CYTOAD による解析

Fas 抗原発現率は、性別では男性 62.0%、女性 56.3% と、男性に多く、年齢別では60才以下は 55.4%、61才以上は 67.3% と高齢者に発現率は高くなったが、有意差は得られなかった。組織型別、病期別、T、N、M 因子別では各群間に有意差がなかったが、ほとんど全ての因子での発現率は 50% を超えた。

Table 4. Correlation between clinicopathological factors and incidence of Fas antigen expression in 67 cases of group treated by surgery alone to lung cancer

Clinicopathological factors	No. of positive cases / no. of cases tested	Fas antigen expression rate (%)	P Value	CYTOAD of Fas antigen ^{b)}	P Value
Sex					
Male	24/48	50.0	NS*	0.258 ± 0.052	NS**
Female	7/19	36.8		0.265 ± 0.052	
Age (yrs)					
≤60	14/22	63.6	p<0.05*	0.249 ± 0.052	NS**
≥61	17/45	37.8		0.268 ± 0.050	
Histology					
Adenoca.	14/30	46.7	NS*	0.264 ± 0.052	NS***
Epidermoid ca.	12/27	44.4		0.259 ± 0.060	
Large cell ca.	4/ 8	50.0		0.258 ± 0.021	
Small cell ca.	1/ 2	50.0		0.200 ± 0.000	
Stage ^{a)}					
I	9/25	36.0	NS*	0.243 ± 0.031	NS***
II	3/10	30.0		0.237 ± 0.015	
III A	5/10	50.0		0.330 ± 0.063	
III B	7/12	58.3		0.237 ± 0.026	
IV	7/10	70.0		0.259 ± 0.052	
T factor ^{a)}					
T1	9/22	40.9	NS*	0.241 ± 0.030	NS***
T2	10/23	43.5		0.263 ± 0.060	
T3	7/13	53.8		0.386 ± 0.064	
T4	5/ 9	55.6		0.243 ± 0.030	
N factor ^{a)}					
N0	13/32	40.6	NS*	0.261 ± 0.054	NS***
N1	8/16	50.0		0.231 ± 0.021	
N2	9/17	52.9		0.284 ± 0.060	
N3	1/ 2	50.0		0.230 ± 0.000	
N1-3	18/35	51.4		0.258 ± 0.051	
M factor ^{a)}					
M0	23/56	41.1	NS*	0.261 ± 0.052	NS**
M1	8/11	72.9		0.254 ± 0.050	

Adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma; large cell ca., large cell carcinoma; small cell ca., small cell carcinoma.

a) Stages and TNM factors were classified postoperatively according to the general rule for clinical and pathological record of lung cancer (the Japan Lung Cancer Society).

b) Values of CYTOAD of Fas antigen represent $\bar{x} \pm SD$.

*Chi-square test. **Mann-Whitney U test. ***Kruskal-Wallis test. NS, not significant.

CYTOAD による解析では各因子間に有意差はみられなかった(表5).

3. IT 群における Fas 抗原発現率の CYTOAD による解析
Fas 抗原発現率において, 性別では男性 64.7%, 女性 100% と, 女性に高かったが, 有意差はなかった. 年齢別では60才以下は 76.4%, 61才以上は 65.2% と若年者に高かったが, 有意差はなかった. 組織型別では差はなく, 病期別では I 期 33.3%, II 期非検査, III A 期 76.2%, III B 期 63.6%, IV 期 80.0% と, III, IV 期の発現率が高くなる傾向を認めたが, 有意差はなかった. T 因子別では, T1; 33.3%, T2~T4; 81.2% と T2 以上の例に発現率が高く, N 因子別では N0; 40.6%, N1~3; 68.0% とリンパ節転移陽性例が, また M 因子別では M0; 68.6%, M1; 80.0% と遠隔転移例が高かったが, 各々有意差は認めなかった. CYTOAD は, 60才以下の若年者が60才以上の高齢者に比べて有意で高値を示した ($p < 0.05$). しかし, その他の各因子間に有意差はみられなかった(表6).

4. 術前無治療群と術前化学療法群 (BAI 群, IT 群) における Fas 抗原発現率の CYTOAD による比較

術前無治療群の Fas 抗原発現率は 46.3% (67例中31例) と低く, 術前化学療法群の発現率は BAI 群 61.1% (108例中66例), IT 群 70.0% (40例中28例) と有意に高率を示した ($p < 0.05$) (図 7A). 平均 CYTOAD の検討でも, 術前無治療群 0.259 ± 0.051 , BAI 群 0.280 ± 0.059 , IT 群 0.300 ± 0.052 と有意に術前化学療法群が高値を示した ($p < 0.01$) (図 7B).

III. Fas 抗原発現率と生存率の比較

1. 術前無治療群と術前化学療法群 (BAI 群と IT 群) における Fas 抗原陰性例と陽性例の生存率の比較

術前無治療群では Fas 抗原陰性例の生存率が陽性例に比べて, 有意に予後が良好であった ($p < 0.05$) (図 8A). BAI 群と IT 群を合わせた術前化学療法群の Fas 抗原陰性例と陽性例の生存率を比較すると, Fas 抗原陽性例が有意に予後が良好であった ($p < 0.01$) (図 8B).

Table 5. Correlation between clinicopathological factors and incidence of Fas antigen expression in 108 cases of group treated by BAI to lung cancer

Clinicopathological factors	No. of positive cases / no. of cases tested	Fas antigen expression rate (%)	P Value	CYTOAD of Fas antigen ^{b)}	P Value
Sex					
Male	52/92	62.0	NS*	0.282 ± 0.062	NS**
Female	9/16	56.3		0.264 ± 0.038	
Age (yrs)					
≤ 60	31/56	55.4	NS*	0.279 ± 0.054	NS**
≥ 61	35/52	67.3		0.281 ± 0.064	
Histology					
Adenoca.	22/39	56.4	NS*	0.265 ± 0.034	NS***
Epidermoid ca.	41/62	61.2		0.291 ± 0.069	
Earge cell ca.	2/ 5	40.0		0.245 ± 0.035	
Small cell ca.	1/ 2	50.0		0.250 ± 0.000	
Stage ^{a)}					
I	17/25	68.0	NS*	0.275 ± 0.056	NS***
II	9/11	81.8		0.298 ± 0.070	
III A	22/43	51.2		0.285 ± 0.069	
III B	2/15	53.3		0.258 ± 0.030	
IV	10/14	71.4		0.280 ± 0.052	
T factor ^{a)}					
T1	9/11	81.8	NS*	0.282 ± 0.056	NS***
T2	28/42	66.7		0.277 ± 0.050	
T3	19/39	48.7		0.290 ± 0.074	
T4	10/16	62.5		0.267 ± 0.045	
N factor ^{a)}					
N0	25/41	61.0	NS*	0.278 ± 0.055	NS***
N1	17/24	70.8		0.292 ± 0.055	
N2	23/42	51.1		0.274 ± 0.067	
N3	1/ 1	100.0		0.260 ± 0.000	
N1-3	41/67	61.2		0.281 ± 0.062	
M factor ^{a)}					
M0	57/95	60.0	NS*	0.280 ± 0.060	NS**
M1	9/13	62.9		0.282 ± 0.055	

Adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma; large cell ca., large cell carcinoma; small cell ca., small cell carcinoma.

a) Stages and TNM factors were classified postoperatively according to the general rule for clinical and pathological record of lung cancer (the Japan Lung Cancer Society).

b) Values of CYTOAD of Fas antigen represent $\bar{x} \pm SD$.

*Chi-square test. **Mann-Whitney U test. ***Kruskal-Wallis test. NS, not significant.

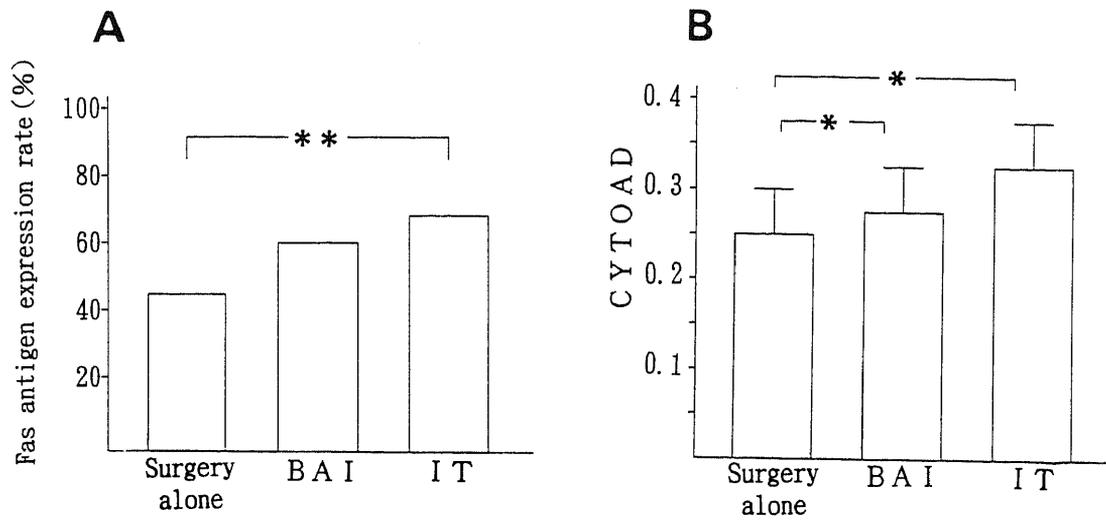


Fig. 7. Relationship between three therapeutic groups and incidence of Fas antigen expression and CYTOAD of Fas antigen. (A) Fas antigen expression rate in surgery alone group, BAI group, and IT group; Vertical bars represent percent. (B) CYTOAD of Fas antigen in surgery alone group, BAI group, and IT group; Vertical bar represent $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.05$, by chi-square test. * $P < 0.01$, by Fisher's least significant difference test.

Table 6. Correlation between clinicopathological factors and incidence of Fas antigen expression in 40 cases of group treated by IT to lung cancer

Clinicopathological factors	No. of positive cases / no. of cases tested	Fas antigen expression rate (%)	P Value	CYTOAD of Fas antigen ^{b)}	P Value
Sex					
Male	22/34	64.7	NS*	0.296 ± 0.051	NS**
Female	6/ 6	100.0		0.315 ± 0.058	
Age (yrs)					
≤ 60	13/17	76.4	NS*	0.326 ± 0.057	$p < 0.05^{**}$
≥ 61	15/23	65.2		0.278 ± 0.036	
Histology					
Adenoca.	10/14	71.4	NS*	0.325 ± 0.053	NS***
Epidermoid ca.	12/17	70.6		0.296 ± 0.056	
Large cell ca.	2/ 2	100.0		0.265 ± 0.021	
Small cell ca.	4/ 7	57.1		0.268 ± 0.021	
Stage ^{a)}					
I	1/ 3	33.3	NS*	0.230 ± 0.000	NS***
II	0/ 0	—		—	
III A	16/21	76.2		0.308 ± 0.050	
III B	7/11	63.6		0.289 ± 0.027	
IV	4/ 5	80.0		0.310 ± 0.090	
T factor ^{a)}					
T1	4/12	33.3	NS*	0.283 ± 0.038	NS***
T2	18/20	90.0		0.306 ± 0.059	
T3	3/ 3	100.0		0.305 ± 0.051	
T4	2/ 5	40.0		0.280 ± 0.000	
N factor ^{a)}					
N0	9/15	40.6	NS*	0.300 ± 0.058	NS***
N1	0/ 3	—		—	
N2	12/15	80.0		0.306 ± 0.054	
N3	5/ 7	71.4		0.286 ± 0.043	
N1-3	17/25	68.0		0.310 ± 0.051	
M factor ^{a)}					
M0	24/35	68.6	NS*	0.299 ± 0.046	NS**
M1	4/ 5	80.0		0.310 ± 0.090	

Adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma; large cell ca., large cell carcinoma; small cell ca., small cell carcinoma.

a) Stages and TNM factors were classified before IT according to the general rule for clinical and pathological record of lung cancer (the Japan Lung Cancer Society).

b) Values of CYTOAD of Fas antigen represent $\bar{x} \pm SD$.

*Chi-square test. **Mann-Whitney U test. ***Kruskal-Wallis test. NS, not significant. —, not tested.

2. BAI 群における Fas 抗原発現率と生存率の検討

1) BAI の注入薬剤数と Fas 抗原発現率および CYTOAD
Fas 抗原発現率は 1 剤投与群 57.8% (45 例中 26 例), 2 剤 (および 3 剤) 併用群 64.3% (42 例中 27 例), OK432 を使用した 4 剤併用群 67.0% (21 例中 14 例) であり, 制癌剤の薬剤数を増すごとに Fas 抗原の発現率が高くなる傾向が認められたが, 有意差はなかった (図 9A). CYTOAD においては 1 剤投与群 0.251 ± 0.042 , 2 剤 (および 3 剤) 併用群 0.296 ± 0.056 , 4 剤併用群 0.304 ± 0.073 で, 薬剤数を増すごとに有意に高値となった ($p < 0.05$) (図 9B).

2) BAI 群の Fas 抗原陰性例と陽性例の生存率の比較

BAI 群の全体では Fas 抗原陽性例が Fas 抗原陰性例に比べて, 有意に予後が良好であり ($p < 0.05$) (図 10A), Fas 抗原陽性

例の 3 年生存率 (3 生率) 36.4%, 5 年生存率 (5 生率) 31.8%, 10 年生存率 (10 生率) は 25.6% であった. 組織型別では, 扁平上皮癌の Fas 抗原陽性例が有意に予後良好であった ($p < 0.05$) (図 10B). N 因子別では, リンパ節転移陽性の Fas 抗原陽性例が, 有意に予後が良好であった ($p < 0.05$) (図 10C). 注入薬剤数別では, OK432 を併用する 4 剤の多剤併用群が, 予後良好な傾向を認めた (図 10D).

3. IT 群における Fas 抗原発現率と生存率の検討

1) IT 施行回数と Fas 抗原発現率および CYTOAD

Fas 抗原発現率は, 1 コース 57.2% (7 例中 4 例), 2 コース 66.7% (24 例中 16 例), 3 コース 88.9% (9 例中 8 例) であり, 施行回数と比例して有意差はないが, 高率に発現する傾向を示した (図 11A). CYTOAD においても, 1 コース 0.272 ± 0.056 ,

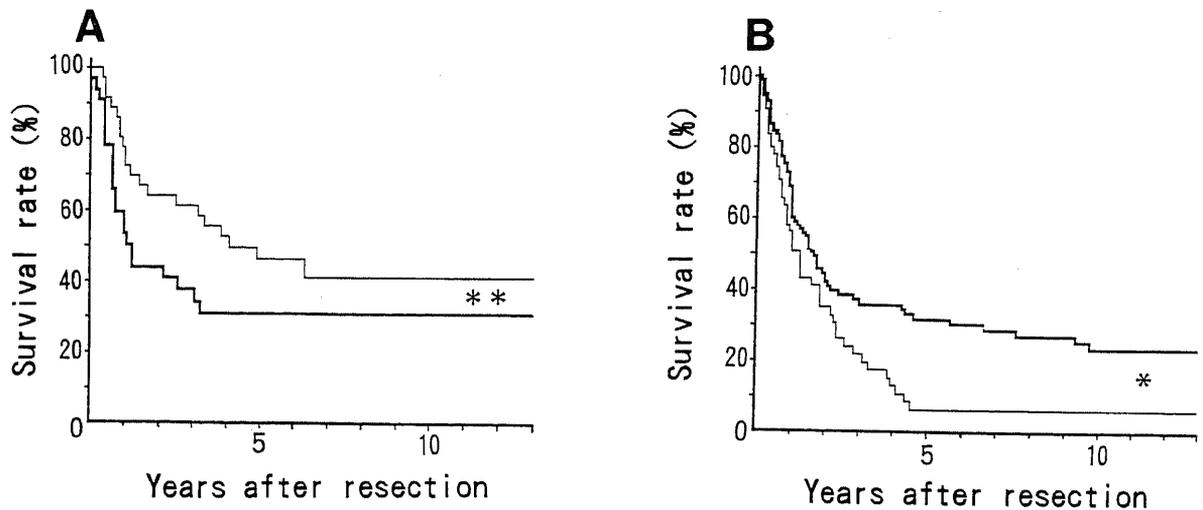


Fig. 8. Comparison of survival curves between Fas antigen-positive cases and Fas antigen-negative cases in surgery alone group and BAI and IT groups according to Kaplan-Meier method. (A) Total cases of surgery alone group. (B) Total cases of BAI and IT groups. —, Fas antigen-positive cases; - - -, Fas antigen-negative cases. ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ by Cox-Mantel test.

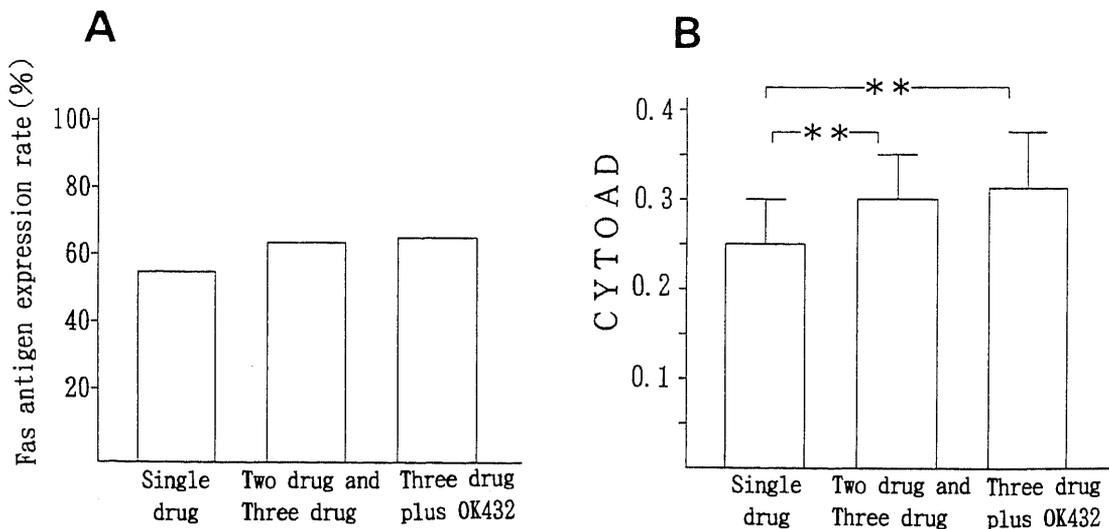


Fig. 9. Relationship between the number of infusion drugs and Fas antigen expression rate and CYTOAD of Fas antigen. (A) Fas antigen expression rate in each BAI group. Vertical bars represent percent. (B) CYTOAD of Fas antigen in each BAI group. Vertical bars represent $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.05$, by Fisher's least significant difference test.

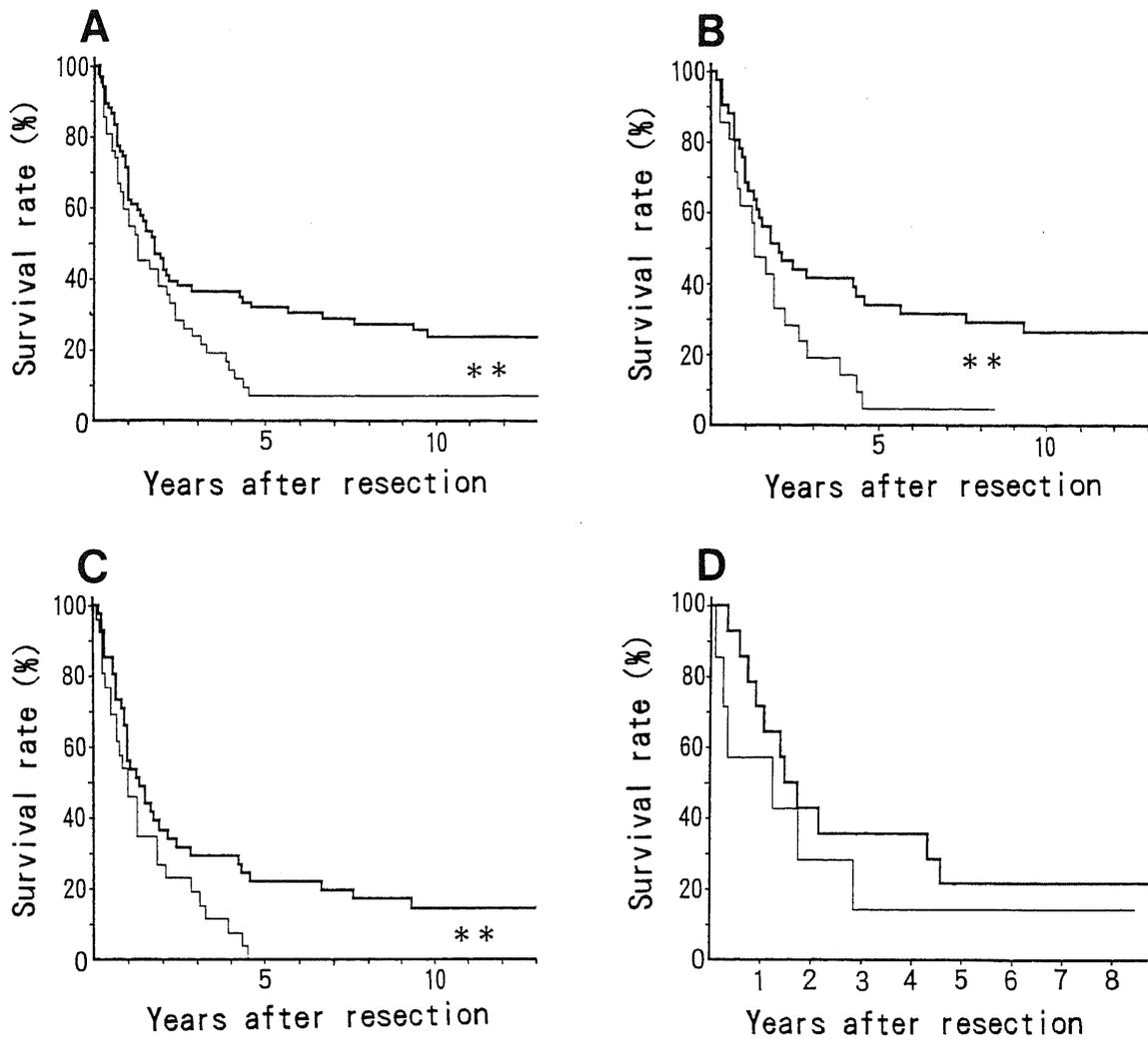


Fig. 10. Comparison of survival curves between Fas antigen-positive cases and Fas antigen-negative cases in BAI group according to Kaplan-Meier method. (A) Total cases of BAI group. (B) Cases with epidermoid carcinoma. (C) Cases with lymph node metastases. (D) Cases of three drug plus OK432. —, Fas antigen-positive cases; - - -, Fas antigen-negative cases. ** $P < 0.05$, by Cox-Mantel test.

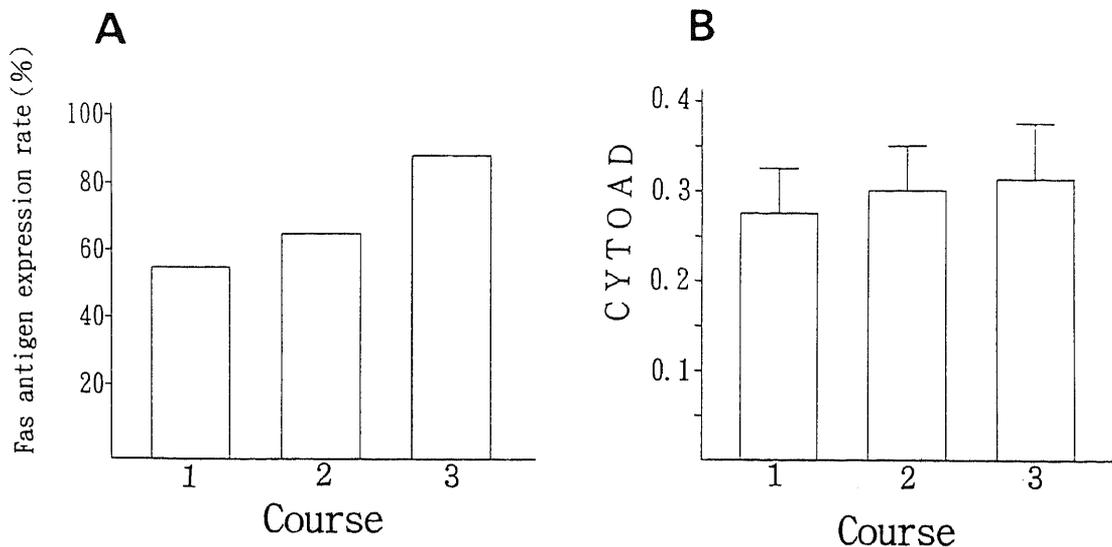


Fig. 11. Relationship between the number of courses of Fas antigen expression rate and CYTOAD of Fas antigen in IT group. (A) Fas antigen expression rate in each IT group. Vertical bars represent percent. (B) CYTOAD of Fas antigen in each IT group. Vertical bars represent $\bar{x} \pm SD$.

2 コース 0.303 ± 0.047 , 3 コース 0.309 ± 0.062 で, 有意差はないが, コース回数に比例して高値となった (図 11B).

2) IT による病期改善 (down stage) 例の生存率の検討

N2 非小細胞肺癌32例について検討した. 病期改善した症例は 8 例 (25%) で, III A 期から I 期へは 6 例, III A 期から II 期へは 1 例, III B 期から I 期へは 1 例であった (図12). 病期改善の 8 例と病期不変の24例の生存率を検討した結果, 病期改善例は 3 年生存率 87.5% であり, 有意に予後が良好であった ($p < 0.05$) (図13). また, 病期改善例の Fas 抗原発現率は陽性 7 例, 陰性 1 例であり, 87.5% の高値を示した.

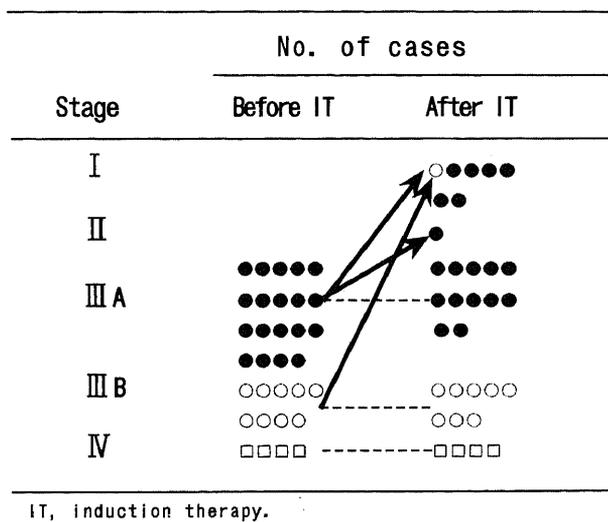


Fig. 12. Pathological response of the N2 non-small cell lung cancer in IT group, which was improved in stage. Classified stage before IT: ●, case of stage III A; ○, case of stage III B; □, case of stage IV; →, down-stage cases; -----, cases of no change in stage.



Fig. 13. Comparison of survival curves in down-stage cases by IT with in the cases of no change in stage by IT according to Kaplan-Meier method. Case of N2 non-small cell lung cancer treated by IT: —, down-stage cases by IT; - - -, cases of no change in stage; ·····, total cases. ** $P < 0.05$, by Cox-Mantel test.

3) IT 群の Fas 抗原陰性例と Fas 抗原陽性例の生存率の検討

IT 群全体40例の Fas 抗原陰性例と Fas 抗原陽性例の予後について検討した. Fas 抗原陽性例の予後は 3 年生存率 37.5%, 5 年生存率 33.6% で Fas 抗原陰性例に対して, 有意差はないが, 比較的良好な傾向を認めた (図 14A). 病期別では, III, IV 期で Fas 抗原陽性例は, 有意差はないが, 比較的良好な傾向を認め

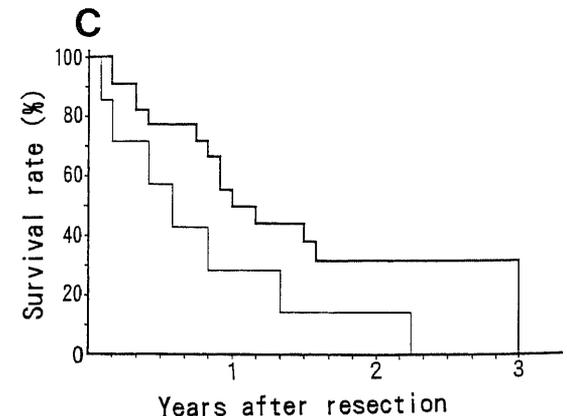
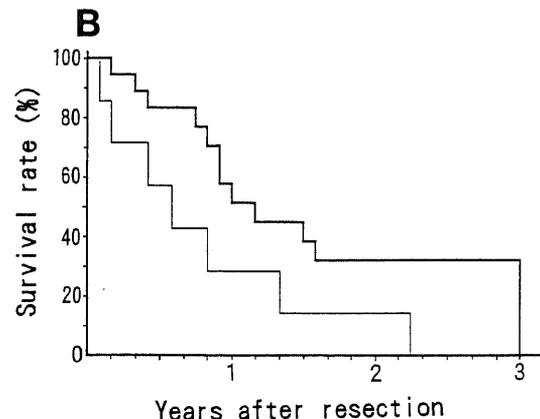
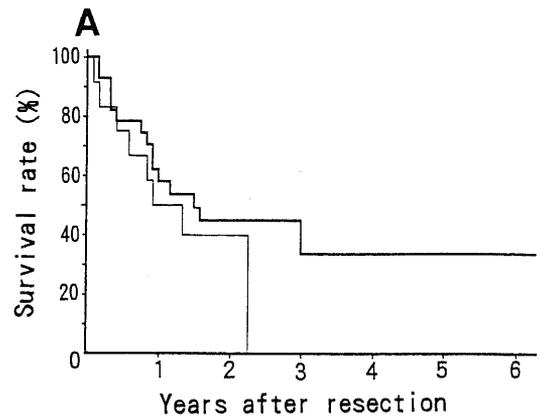


Fig. 14. Comparison of survival curves between Fas antigen-positive cases and Fas antigen-negative cases in IT group according to Kaplan-Meier method. (A) Total cases of IT group. (B) Cases of stage III+IV. (C) Cases with lymph node metastases. —, Fas antigen-positive cases; - - -, Fas antigen-negative cases.

た(図 14B)。N 因子別では、リンパ節転移陽性の Fas 抗原陽性例で、有意差はないが、予後が比較的良好であった(図 14C)。

考 察

近年、アポトーシスが各分野で極めて注目されている。悪性腫瘍においても、それ自体に生理的細胞死であるアポトーシスが少ないながらも観察される。この計画された細胞死の機構を解明すれば、外部からの刺激で癌細胞をアポトーシスに誘導する癌治療が期待できる可能性がある。

原発性肺癌の長期治療成績は、他の悪性腫瘍と比較して不良である。適切に組み合わせた制癌剤の術前化学療法によって、肺癌のアポトーシス誘導が可能であるか否かは、癌治療の臨床に、極めて興味深いところである¹⁸⁾。

従来肺癌の化学療法の組織学的効果の判定は癌巣の壊死の範囲とその中に残存する癌細胞の質と量により検討されてきた。本研究では、免疫組織化学的手法を用いて、制癌剤による癌巣の壊死変性の再検討、癌細胞にアポトーシスを誘導する Fas 抗原の発現の有無を検索し、術前化学療法の組織学的効果を再検討し、同時に癌細胞の Fas 抗原発現率と発現量について臨床病理学的に比較検討した。

1972年、Kerr 氏¹⁹⁾は壊死とは形態学的に異なる細胞死を詳細に報告し、初めて“アポトーシス”と命名した。アポトーシスの光顕レベルでの主な形態学的変化は、核の濃縮、クロマチンの凝集、細胞質の濃縮と細胞の大きさの縮小であり、電子顕微鏡レベルでは小胞体は拡張はするが、ミトコンドリアやリソソームは保持され、細胞膜も保たれている。その後、核の凝縮、断片化が起こり、オルガネラや断片化した核を含んだ膜被包性の球状小体化(apoptotic body)現象が起こる。最後はマクロファージに貪食され、炎症なしの細胞死に至る^{20,21)}。この生理的ともいえるアポトーシスが後天性免疫不全症候群や他のウイルス疾患の病態²²⁾、温熱処理²³⁾、グルココルチコイド投与²⁴⁾、低線量の放射線照射²⁵⁾、そして DNA 傷害・修復に関連するトポイソメラーゼ阻害剤のエトポシドやシスプラチンに代表される制癌剤²⁶⁻²⁸⁾を負荷した条件下で認められた。つまり、癌細胞を制癌剤で処理した場合のような非生理的な各種ストレスによってもアポトーシスが誘導されることが判明している。

最近の癌遺伝子研究により、癌とアポトーシスの関係が明らかにされつつある。ヌードマウスに腫瘍を移植した後、p53を導入、発現させると、腫瘍はアポトーシスを生じ縮小する³⁰⁾。p53欠損マウスにおいては胸腺細胞のガンマー線照射によるアポトーシスは回避されたが、同マウスでのグルココルチコイドによるアポトーシスは誘導された^{31,32)}。つまり、癌遺伝子によるアポトーシスの経路はすくなくとも2種類あることが証明されており、今後の癌遺伝子研究により、さらに多くのアポトーシスの経路が解明される可能性がある。濾胞性Bリンパ腫から発見された bcl-2 は細胞寿命の延長³³⁾や、グルココルチコイド誘発のアポトーシスを抑制することが知られてきた^{34,35)}。また bcl-2 は c-myc により癌細胞が獲得した優位な細胞増殖能のアポトーシスを抑制することで、癌化を促進すると考えられている²⁹⁾。確かに癌細胞は無秩序に増え続け、大きな腫瘍を形成する。しかし、実際には腫瘍組織における分裂像の数と増殖速度との間に解離があり、多くの腫瘍細胞の細胞周期は40~100時間であるのに対し、腫瘍全体の倍加時間ははるかに長く50~100日という場合が多い。これは癌細胞自体のアポトーシスに

よる細胞数の損失によるためと考えられる³⁶⁾。この知見から、一見、無秩序に増え続けていた癌細胞にもその遺伝子にある程度の細胞死のプログラムが組み込まれていることを示している。さらに、この癌細胞のアポトーシスは細胞性免疫反応による細胞除去の可能性を示唆している。

本研究において、術前無治療群ではT因子の増加や病期の進行に伴い、Fas 抗原の発現率が高率になる傾向が認められた。組織像では、Fas 抗原陽性の変性した癌細胞が、腫瘍の壊死巣の辺縁に認められた。また HE 染色による光顕像でも、少数ながら、核の凝縮、断片化が進みアポトーシスに陥った癌細胞が認められた。この所見から、肺癌細胞はそれ自体に正常細胞と同様に、細胞死による細胞数制御の機構が、少ないながらも働いていることが示唆された。

Yonehara 氏⁴⁾はヒト細胞表層構造に対するモノクローナル抗体で、それ自身が細胞致死活性を持ち、細胞外よりアポトーシスを誘導する抗体をえ、これを抗 Fas モノクローナル抗体と名付けた。Itoh 氏³⁷⁾は、Fas 抗原は319個のアミノ酸ペプチドからなる腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF)受容体や神経成長因子(nerve growth factor, NGF)受容体ファミリーの一員であることを報告し、ヒト Fas 抗原をマウスTリンパ腫細胞(WL19L または L929)に導入し、抗 Fas モノクローナル抗体によって、アポトーシスが誘導される過程を確認した。Suda 氏³⁸⁾は、細胞性免疫の主役を担っているキラーT細胞による細胞障害性に標的細胞の Fas 抗原が関与することを述べ、これに対応する細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)に TNF ファミリーに属するタイプII蛋白質である Fas リガンドの存在を報告した。つまり、Fas 抗原陽性細胞が CTL の Fas リガンドにより、容易にアポトーシスが誘導され、細胞死に至る機構が解明された。

Fas 抗原は脾、脳、精巣、骨髄などではほとんど発現していないが、胸腺、心、肝、卵巣、そして肺などでその発現が認められている³⁹⁾。アポトーシスの経過は非常に速く、最終像である球状小体化の形成までの時間はわずか数分間であり、これも2~3時間以内にマクロファージにより貪食されてしまう⁴⁰⁾。このため、アポトーシス像を動的に光顕で経時的に観察することは困難である。したがって本研究では、アポトーシスを誘導する Fas 抗原を抗 Fas モノクローナル抗体を用い、ABC法⁴¹⁾による免疫組織化学染色で検索し、術前化学療法後の肺癌病巣部のどの部位に Fas 抗原が発現しているか、そして残存する肺癌細胞の Fas 抗原発現の有無を検討した。従来、化学療法による壊死巣といわれていた部位の周辺に残存する癌細胞に、強い Fas 抗原発現が認められた。また、その壊死巣の内部には、細胞質は保たれ凝縮傾向の不安定な核を有する Fas 抗原陽性細胞が認められた。この壊死像は制癌剤の直接的な殺細胞作用を表わしているが、血流の少ない部分は制癌剤濃度が低くなり、癌細胞に Fas 抗原が発現し、壊死巣に遊走した浸潤リンパ球の Fas リガンドによりアポトーシスに陥った像も混在していると思われた。この所見から、Fas 抗原の発現は術前化学療法の組織学的効果判定の指標となりうると思われた。

Fas 抗原の定量測定は、抗 Fas モノクローナル抗体を用いてのフローサイトメトリーやウエスタンブロッティングが一般的で、またアポトーシスの検出法としては、Gavrieli 氏⁴²⁾のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ調停性ピオチン標識 2'デオキシウリジン 5'三リン酸 ニック エン

ド ラベリング [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling, TUNEL] 法が一般的である。前述したように、アポトーシスは元来、Kerr らが形態学的観察から定義した歴史があり、研究を進めるには Fas 抗原の定量測定のみならず、顕微鏡による前述の形態学的変化の観察が重要であると考えられる。そこで、本研究では両方の客観的検討が可能な CAS 200 を使用してデータを処理し、解析した。Bacus ら⁶¹⁾の開発した CAS 100 システムは 1 チャンネルの測光センサーとキャリブレーションシステムを有し、表示画像上の細胞核の DNA 定量分析や核面積や異形度等の形態分析が可能となった。続いて、彼らは 2 チャンネルの測光センサーを有する CAS 200 システムを開発した。この装置は免疫組織化学染色の定量を可能にした画期的なものであった。一方、フローサイトメトリーは高速、高精度で多量の細胞浮遊検体の核 DNA 量などを詳細に評価するが、測定細胞の形態観察が不可能である欠点も持っている。検体の同一性を保てない可能性があり、フローサイトメトリーによる測定には若干の問題点も指摘されている⁴⁵⁾。CAS 200 はこの欠点を補うイメージサイトメトリーとしての立場を確立しつつある。Esteban ら⁴⁶⁾はホルマリン固定パラフィン包埋の乳癌組織 45 例のエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体の免疫組織化学染色を行い、CAS 200 の 2 色 (2 波長) 測光システムを用いて定量分析をした結果、以前に報告したデータと比べて有意な改善が認められたと述べた。Visakorpi⁴⁷⁾は 165 例の前立腺癌の予後因子として PCNA の DNA フローサイトメトリー解析と免疫組織化学染色の CAS 200 による画像解析を比較検討して優劣はなかったと報告した。両者の解析法はかなり良い相関が得られたという報告が多い^{48)~50)}。Cance ら¹⁰⁾は 44 例の肉腫原発巣と 12 例の肉腫転移巣の計 66 例の網膜芽細胞腫遺伝子 (retinoblastoma-susceptibility gene, Rb 遺伝子⁵¹⁾⁵²⁾を ABC 法による免疫組織化学染色を行い、CAS 200 で画像解析を行った。その際 CAS 200 の画像解析で、まず陰性対照のヒストグラムをもとに 0 点のカット・オフ値を OD 0.25 と決め、この基準以上を Rb 遺伝子陽性と定めている。同様な解析法を用いた今回の研究のヒストグラムでは、CYTOAD 0.200 を境に発色強度の異なる 2 群に分かれた。この値をカット・オフ値と決め、肺癌治療の術前化学療法の有無に分け、Fas 抗原の発現率と発現定量そして Fas 抗原陽性例と Fas 抗原陰性例の予後の差について比較検討した。

IT の意義は術前に化学療法を施行することにより、進行癌の病期改善を図り、切除率、完全切除率の向上を計るだけでなく、術前から存在する潜在性遠隔転移巣に対し、腫瘍への血管系が保持されている術前に制癌剤を有効に投与し、さらに手術操作によって生じる癌細胞の血中散布、胸腔播種等を抑制することにある^{53)~55)}。教室では局所の術前化学療法として 137 例の BAI を施行し、最長約 20 年の経過観察を行った¹⁰⁾。1984 年からは従来の 3 制癌剤に OK432 を加えた 4 剤を動注し、その近接効果、および遠隔効果を検討した。その結果、扁平上皮癌に対する BAI 4 剤併用の有効率は非常に高く、縮小効果は著明であることがわかった。また清水⁵⁶⁾は BAI の OK432 投与後、転移のない領域リンパ節リンパ球のインターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) 産生量が対照 (肺癌患者あるいは健康人の末梢血リンパ球) に比べて 10~100 倍高値を示すことを報告した。本研究において、BAI 群の制癌剤の投与薬剤数が増す毎

に Fas 抗原の発現率が高くなる傾向を示し、しかも Fas 抗原の発現量を表す CYTOAD は有意に高値となった ($p < 0.05$)。さらに Fas 抗原陽性例は Fas 抗原陰性例より有意に予後が良好であり ($p < 0.01$)、BAI 群の扁平上皮癌例で Fas 抗原陽性例は陰性例に比べて、有意に予後良好であり ($p < 0.05$)、またリンパ節転移陽性例でも Fas 抗原陽性例は陰性例より有意に予後が良好であった ($p < 0.05$)。このことは有効な制癌剤の多剤併用により、癌細胞に Fas 抗原が誘導され、しかも OK432 により領域リンパ節リンパ球に IL-2 が多量に生産され、癌細胞に対する CTL 活性がさらに賦活化され、Fas 抗原を発現した癌細胞は CTL からの Fas リガンドを介した細胞死のシグナルを受けアポトーシスに誘導されたものと推察された。事実、術前化学療法群の HE 染色と免疫組織化学染色の病理組織像で、腫瘍の壊死巣とその周辺に Fas 抗原陽性の変性した癌細胞 (核の断片化、球状小体化の形成) が多数散見された。

Rosell ら⁵⁷⁾は III A 期の非小細胞肺癌において、IT 群 (MMC, イフォスファミド, CDDP の 3 コース) 30 例と外科手術単独群の 30 例との無作為比較試験を行った。結果として、中間生存期間は外科手術単独群の 8 ヶ月に対し IT 群は 26 ヶ月と有意に予後良好であり ($p < 0.001$)、再発率は 74% に対し、IT 群は 56% と低率であったと述べている。また喫煙者の肺癌との強い関係を報告された癌遺伝子 K-ras⁵⁸⁾の発現率は、外科手術単独群は 42% に対し IT 群は 15% と低率であったと報告した。IT により微少転移巣が制御された結果として再発率や K-ras 遺伝子が減少し、良好な予後が得られたと考えられる。本研究においても、IT の Fas 抗原陽性例の予後良好な理由は、リンパ節転移などの微少転移巣の癌細胞が制癌剤でアポトーシスに誘導され細胞死に陥り、外科治療がより根治的な手術となったことによるものと思われた。IT 群の転移性リンパ節の免疫組織化学染色では、転移癌細胞の形質内に Fas 抗原陽性の褐色顆粒や、腫瘍壊死巣内に Fas 陽性のアポトーシスに陥った癌細胞が認められた。

化学療法後の腫瘍の病理組織学的な破壊変性像は、これまで制癌剤による癌細胞の壊死によるものと思われてきた。しかし、本研究で示されたように、腫瘍に対する化学療法後の破壊変性像の所見は、癌細胞の壊死像とアポトーシス像が混在した組織像であることが明らかになった。このような所見は術前化学療法、免疫療法または放射線療法を加えた術前化学療法後の組織像に高頻度に認められた。一般にはアポトーシスを誘導する薬剤でも、高濃度を投与すると癌細胞は壊死となる。つまり、制癌剤がアポトーシスを誘導するか、壊死変性を起こすかは癌細胞の種類そして薬剤に対する感受性と濃度によると考えられる³⁰⁾。今後、このアポトーシスを利用した癌の化学療法を考えるとき、癌細胞が持つ Fas, p53, c-myc, bcl-2, K-ras, Rb などの遺伝子研究を深め、それぞれの癌細胞でのアポトーシスを誘導する遺伝子プログラムを解明しなければならない。もし将来これが解明されたなら、このプログラムを利用して、Fas 抗原を誘導する薬剤を低濃度で少量投与し、癌細胞に Fas 抗原を発現させ、Fas リガンドなどのサイトカイン^{59)~62)}を与えることで、選択的に癌細胞を自滅させる新しい免疫化学療法が期待できる。また制癌剤ではなく、活性型ビタミン A であるオールトランス型レチノイン酸によって白血病細胞を分化誘導させ、最終的にはアポトーシスに陥らせ、マクロファージに貪食させる治療法^{63)~65)}があるが、これを発展させ、肺癌、胃癌、大腸癌

そして肝癌などの固形癌に用いるアポトーシス療法も期待される。

結 論

原発性肺癌215例を対象に、術前化学療法の投与方法別に3治療群に分け、抗 Fas モノクローナル抗体を用い、Fas 抗原の発現率を検討した。また CAS 200 を使用して Fas 抗原の発現量を測定し、以下の結論を得た。

1. 術前無治療群の Fas 抗原発現率は 46.3% であったのに対し、BAI 群 61.1%, IT 群 70% と術前化学療法群が有意に高率であった ($p < 0.05$)。Fas 抗原発現量を表す CYTOAD に関しても、術前無治療群 0.259 ± 0.051 , BAI 群 0.280 ± 0.059 , IT 群 0.300 ± 0.052 と有意の差で術前化学療法群が高値を示した ($p < 0.01$)。

2. Fas 抗原は BAI 群において、制癌剤の投与薬剤数が増すごとに発現率が高くなる傾向を示し、CYTOAD は 1 剤群 0.251 ± 0.042 , 2 剤 (および 3 剤) 群 0.296 ± 0.056 , 4 剤群 0.304 ± 0.073 で多剤投与が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。IT 群では、投与回数に比例し、Fas 抗原の高率、CYTOAD が高値となる傾向を認めたが、有意差はなかった。

3. 術前無治療群と異なり、術前化学療法群 (BAI 群と IT 群) の Fas 抗原陽性例は Fas 抗原陰性例より有意に予後が良好であった ($p < 0.01$)。組織型別では、BAI 群の扁平上皮癌の Fas 抗原陽性例の生存率は陰性例に比べて有意に予後が良好であった ($p < 0.05$)。その他の組織型では Fas 抗原陽性例と陰性例の生存率に有意の差はなかった。IT 群の組織型別では、生存率に有意差はなかった。病期別では、BAI 群、IT 群ともに Fas 抗原陽性例と陰性例の生存率にとくに有意差はなかった。BAI 群のリンパ節転移陽性の Fas 抗原陽性例は陰性例と比べると有意に予後が良好であった ($p < 0.05$)。IT 群リンパ節転移陽性の Fas 抗原陽性例は生存率に有意差はなかったが、予後良好の傾向を認めた。

4. N2 非小細胞肺癌の IT による病期改善の 8 例は、病期不変の 24 例と比べて有意に予後が良好であった ($p < 0.05$)、Fas 抗原発現率も 87.5% と高値を示した。

5. 術前化学療法群において BAI 群、IT 群の免疫組織化学染色像と H-E 染色像で、腫瘍の癌巣内や壊死巣とその周辺に Fas 抗原陽性の変性した癌細胞が多数散見され、核の断片化や球状小体化形成のアポトーシス像が認められた。

以上の結果から、制癌剤によって、癌細胞に細胞死のシグナルの受容体である Fas 抗原が発現し、腫瘍の一部にはアポトーシスが誘導されると推察された。したがって、Fas 抗原発現の測定は肺癌の術前化学療法の抗腫瘍効果判定に良い指標となると思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際し御指導と御助言をいただきました金沢大学中央検査部病理部野々村昭孝助教授、ならびに金沢大学第三内科中村忍助教授に深謝の意を表します。さらに、本研究に終始御協力と御援助をいただきました金沢大学第一外科肺グループの諸先生方に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は第35回日本肺癌学会総会 (1994年11月, 長崎), 第56回日本臨床外科医学会総会 (1994年11月, 東京) で口演発表し、そして第12回日本呼吸器外科学会総会シンポジウム (1995年5月, 高松) で発表した。

文 献

- 1) Feld R, Rubinstein LV, Weisenberger TH. Sites of recurrence in resected Stage I non-small cell lung cancer: a guide for future studies. *J Clin Oncol* 2: 1352-1358, 1984
- 2) Martini N, Flehinger BJ. The role of surgery in N2 lung cancer. *Surg Clin North Am* 67: 1037-1049, 1987
- 3) 家接健一. 原発性非小細胞癌における p53 蛋白発現および腫瘍増殖能に関する研究. *十全医会誌* 102: 492-505, 1993
- 4) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor for tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756, 1989
- 5) 小笠原 準, 長田重一. Fas 抗原を介した細胞の死と個体の死. *実験医学* 11: 2293-2298, 1993
- 6) Bacus JW, Grace LJ. An optical microscope system of standardized cell measurement and analysis. *Applied Optics* 26: 3280-3293, 1987
- 7) 日本肺癌学会編. 臨床・病理, 肺癌取り扱い規約, 改訂第4版, 24-121 頁, 金原出版, 東京, 1995
- 8) Bacus SS, Ruby SG. Application of image analysis to the evaluation of cellular prognostic factors in breast carcinoma. In PP Rosen, RE Fechner (eds.), *Pathology Annual Part 1, Vol.28*, p179-203, Appleton and Lange, Norwalk, 1993
- 9) 笹野公伸, 鈴木 貴, 名倉 宏. 細胞イメージ分析装置—cell analysis system (CAS)—を用いた免疫組織化学の定量的解析. *細胞* 26: 568-570, 1994
- 10) Cance GW, Brennan FM, Dudas EM, Chun-Ming Huang, Cordon-Cardo C. Altered expression of the retinoblastoma gene production in human sarcomas. *N Engl J Med* 323: 1457-1462, 1990
- 11) Seldinger SI. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography, A new technique. *Acta Radiol* 39: 368-376, 1953
- 12) 沢村献児, 長岡 豊, 李 龍彦, 中村憲二, 井内敬二, 中元賢武, 森 隆, 飯岡壮吾, 山本 晁. 肺癌に対する BAI 併用切除療法, 肺癌. 外科 Mook (草間 悟, 和田達雄, 三枝正裕, 井上権治編), No.25, 122-129 頁, 原出版, 東京, 1982
- 13) Watanabe Y, Shimizu J, Murakami S, Yoshida M, Tsubota M, Iwa T, Kitagawa M, Mizukami Y, Nonomura A, Matsubara F. Reappraisal of bronchial arterial infusion therapy for advanced lung cancer. *Jpn J Surg* 20: 27-35, 1990
- 14) Kris M G, Martini N, Gralla RJ, Pisters KMW, Heelan RT. Primary chemotherapy in stage IIIA non-small cell lung cancer patients with clinically apparent mediastinal lymph node metastases: focus on five-year survivors. *Lung Cancer* 9: 369-376, 1993
- 15) Martini N, Kris MG, Flehinger BJ, Gralla RJ, Bains MS, Burt ME, Heelan R, McCormack PM, Pisters KMW, Rigas JR, Rusch, VW, Ginsberg PM. Preoperative chemotherapy for stage IIIa (N2) lung cancer: the Sloan-Kettering experience with 136 patients. *Ann Thorac Surg* 55: 1365-1374, 1992

- 16) Faber LP, Kittle CF, Warren WH, Bonomi PD, Taylor IV SG, Reddy S, Lee MS. Preoperative chemotherapy and irradiation for stage III non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 47: 669-677, 1989
- 17) Bonami P, Faber LP. Neoadjuvant chemoradiation therapy in non-small cell lung cancer: the Rush University experience. *Lung Cancer* 9: 383-390, 1993
- 18) 片岡之郎, 鶴尾 隆. 抗癌剤とアポトーシス: アポトーシス-細胞死の機構. *実験医学* 11: 2324-2328, 1993
- 19) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 20) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306, 1980
- 21) Waring P, Kos FJ, Mullbacher A. Apoptosis or programmed cell death. *Med. Res Rev* 11: 219-336, 1991
- 22) Kobayashi N, Hamamoto Y, Yamamoto N, Yonehara M, Yonehara S. Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9620-9624, 1990
- 23) Takano YS, Harmon BV, Kerr JFR. Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol* 16: 329-336, 1991
- 24) Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980
- 25) Falkvoll KH, Real C. Quantitative histological changes in a human melanoma xenograft following exposure to single dose irradiation and hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 989-994, 1991
- 26) Hotz MA, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Changes in nuclear chromatin related to apoptosis or necrosis induced by the DNA topoisomerase II inhibitor fostriecin in MOLT-4 and HL-60 cells are revealed by altered DNA sensitivity to denaturation. *Exp Cell Res* 201: 184-191, 1992
- 27) Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 49: 5870-5878, 1989
- 28) Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2: 275-280, 1990
- 29) 瀧波賢治. Cis-diamminedichloroplatinum で誘発される悪性神経腫瘍のアポトーシス. *十全医会誌* 101: 1022-1032, 1992
- 30) Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4495-4499, 1992
- 31) Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-849, 1993
- 32) Clark AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-852, 1993
- 33) Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW. Enforced bcl-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody response and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8661-8665, 1991
- 34) Sentmann CL, Shutter JR, Hockenberry D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 67: 879-888, 1991
- 35) 田丸陽一. 伝染性単核症の活性化T細胞における Fas 抗原蛋白発現, bcl-2 とプログラム細胞死 (アポトーシス). *十全医会誌* 102: 1-11, 1992
- 36) 鈴木紀夫, 酒井一夫, 松本義久. 癌細胞と Apoptosis. *癌と治療* 20: 997-1005, 1993
- 37) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-242, 1991
- 38) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand. A novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178, 1993
- 39) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148: 1274-1279, 1992
- 40) Bursh W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11: 47-852, 1990
- 41) 渡辺慶一, 中根一穂, 長村義之, 名倉 宏, 堤 寛, 多田伸彦, 小松尊至, 和泉伸一, 吉村真一, 伊東丈夫. ABC 法 (Avidin-biotinylated peroxidase complex method). 酵素抗体法 (渡辺慶一, 中根一穂編), 改定 3 版, 188-196 頁, 学際企画, 東京, 1992
- 42) Gavrieli Y, Shtrman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 43) Bacus SS, Hurlbarman E, Chin D, Kiguchi K, Simpson S, Lippman M, Lupu R. A ligand for the erbB-2 oncogene product (gp30) induces differentiation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 3: 401-411, 1992
- 44) Bacus SS, Kiguchi K, Chin D, King CR, Huberman E. Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Mol Carcinog* 3: 350-362, 1990
- 45) Siitonen SS, Isola JJ, Rantala IS, Helin HJ. Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. *Anat Pathol* 99: 226-231, 1993
- 46) Esteban JM, Kandalaf PL, Mehta P, Odom-Maryon

- TL, Bacus S, Battifor, H. Improvement of the quantification of estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tumors by image analysis. *Anat Pathol* 99: 32-38, 1993
- 47) Visakorpi T. Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol* 168: 7-13, 1992
- 48) Danque POV, Chen HB, Patil J, Jagirdar J, Orsatti G, Paronetto F. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors: a comparison of six methods of sample preparation. *Mod. Pathol* 6: 270-275, 1993
- 49) Lee AKC, Dugan J, Hamilton WM, Cook L, Heatly G, Kamat B, Silverman ML. Quantitative DNA analysis in breast carcinomas: a comparison between image analysis and flow cytometry. *Mod Pathol* 4: 178-182, 1991
- 50) Bosari S, Lee AKC, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Flow cytometric and image analysis of colorectal adenocarcinomas: a comparative study with clinical correlations. *Am J Clin Pathol* 99: 187-194, 1993
- 51) Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EYHP. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394-1399, 1987
- 52) 戸塚清一. 網膜芽細胞腫の分子生物学: 眼疾患と分子生物学. *眼科* 33: 1575-1579, 1991
- 53) 渡辺洋宇. 集学的治療の現況と問題点—外科療法の面から—: 肺癌治療の最前線. *癌と化療* 21: 2555-2563, 1994
- 54) 渡辺洋宇, 橋爪泰夫, 山田哲司, 清水淳三, 市橋 匠, 岩 喬. 進行肺癌手術成績向上のための抗腫瘍活性誘導にねざした術前・術後補助療法とその成績. *日外会誌* 88: 1213-1216, 1987
- 55) 渡辺洋宇. 肺癌とリンパ節転移. *日臨外医会誌* 55: 1059-1071, 1994
- 56) 清水淳三. 肺癌の免疫療法に関する研究—特に腫瘍局所における抗腫瘍活性誘導の誘導とその応用に関する研究—. *十全医会誌* 98: 167-174, 1989
- 57) Rosell R, Gomes-Codina J, Camps C, Maestre J, Padille J, Canto A, Mate JL, Li S, Roig J, Olazabal A, Canela M, Ariza A, Skacel Z, Morera-Prat J, Abad A. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 330: 153-158, 1994
- 58) Westra WH, Slebos RJC, Offerhaus GJA, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, Askin FB, Rodenhuis S, Hruban RH. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. *Cancer* 72: 432-438, 1993
- 59) 菅 典道, 戸部隆吉. 癌補助療法としてのおよび療法—新しい癌の補助療法. *外科治療* 58: 529-536, 1988
- 60) Tsuchida H, Takeda Y, Takei H, Shinzawa H, Takahashi T, Sendo F. In vivo regulation rat neutrophil apoptosis occurring spontaneously or induced with TNF- α or cycloheximide. *J Immunol* 154: 2403-2412, 1995
- 61) 古川雄祐, 照井康仁, 大田雅嗣, 斉藤政樹. アポトーシス. *癌治療・今日と明日* 15: 23-27, 1993
- 62) 門田卓二, 武田 力, 勝本善弘, 伊藤康弘, 若杉英二郎, 金井俊雄, 小林哲朗, 島野高志, 門田守人. サイトカイン療法の試み: 消化器癌—最近のトピックス. *外科治療* 72: 443-452, 1995
- 63) Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L, Gu LJ, Wang ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572, 1988
- 64) Warrell RP, Frankel SR, Miller WH Jr, Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A, Gabrilove J, Gordon MS, Dmitrovsky E. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans retinoic acid). *N Engl J Med* 324: 1385-1393, 1991
- 65) 大野竜三. レチノイン酸による白血病の分化誘導療法. *癌治療・今日と明日* 17: 32-35, 1995

Immunohistochemical Study on Fas Antigen Expression and Manifestation of Apoptosis after Preoperative Chemotherapy for Lung Cancer — Analysis by CAS 200 — Kazunori Hikishima, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. Jusen Med Soc., 105, 551 — 568 (1996)

Key words apoptosis, Fas antigen, lung cancer, induction therapy, immunohistochemical staining

Abstract

Evaluation was made as to whether or not Fas antigen, i.e. a receptor of signal for cellular death, is induced in cancer cells by preoperative chemotherapy related to surgical operation for lung cancer, and also as to whether or not the expression of Fas antigen may be an index of the anti-tumor effect of lung cancer chemotherapy and whether it may also become a prognostic factor. A study was performed in 215 cases, including 108 cases (BAI group) treated with bronchial arterial infusion therapy, i.e. a preoperative local chemotherapy, 40 cases (IT group) treated with induction therapy, i.e. a preoperative systemic chemotherapy, and 67 cases (surgery alone group) without preoperative treatment. Using anti-Fas monoclonal antibody, the tissues of lung cancer were processed by immunohistochemical staining, and Fas antigen expression and distribution as well as manifestation of apoptosis were comparatively evaluated from clinicopathological view points. To evaluate Fas antigen expression, a cell analysis system (CAS 200) was used for quantitative analysis of the optical density of immunostained antigen, and the cytoplasm average optical density (CYTOAD) of the antigen was determined and analyzed. Incidence of Fas antigen expression was 46.3% (31 cases) in the surgery alone group, while it was 61.1% (61 cases) in the BAI group and 70.0% (28 cases) in the IT group, being significantly higher in the latter two groups ($p < 0.05$). CYTOAD of Fas antigen was 0.259 ± 0.051 in the surgery alone group, 0.280 ± 0.059 in the BAI group, and 0.300 ± 0.052 in the IT group. Thus the value was significantly higher in preoperative chemotherapy groups ($p < 0.01$). The incidence of Fas antigen tended to increase in proportion to the dosage of carcinostatics in the BAI group. The value of CYTOAD was significantly higher in the multi-drug group, being 0.251 ± 0.042 in the single drug group, 0.296 ± 0.056 in the two drug (and three drug) group, and 0.304 ± 0.073 in the four drug group ($p < 0.05$). In the IT group, Fas antigen expression rate and CYTOAD of Fas antigen showed the trends increasing in proportion to the number of courses, but no significant difference was noted. Survival rate was significantly higher in the Fas antigen-positive cases in preoperative chemotherapy groups (BAI group & IT group) than in the Fas antigen-negative cases, showing significantly better prognosis ($p < 0.01$). In the histological cell type of lung cancer, prognosis was significantly better in the Fas antigen positive cases with squamous cell carcinoma in BAI group ($p < 0.05$). In other cell types, survival rates in Fas antigen-positive cases and Fas antigen-negative cases were not significantly different. In each stage of the BAI group and the IT group, survival rates were not significantly different. Prognosis was significantly better in the Fas antigen-positive cases with lymph node metastases in BAI group ($p < 0.05$). In the IT group, prognosis showed a trend to be better in Fas antigen-positive cases with lymph node metastases than in Fas antigen-negative cases. In 8 of the cases, which were down staged by IT in the cases of N2 non-small cell lung cancer, prognosis was significantly better than in the 24 cases which showed no change in stage by IT ($p < 0.05$). Moreover, the Fas antigen expression rate was as high as 87.5%. In the images of immunohistochemical staining and the images of hematoxylin-eosin staining, necrotic lesions of tumor and a large number of degenerated Fas antigen-positive cancer cells were scattered around the lesions, and fragmentations of nuclei and an apoptotic image showing formation of apoptotic body were noted. In conclusion, these results reveal that Fas antigen, i.e. receptor of cell death signal, appeared in cancer cells due to carcinostatics, and it was estimated that apoptosis may have been induced in a part of the tumor. Therefore, the immunohistochemical expression of Fas antigen in resectable specimens seems to be a good indicator for identifying the effects of preoperative chemotherapy in lung cancer.