

# 原発性肺癌切除例における肺癌細胞の腫瘍内多様性に関する研究 増殖細胞核抗原と核DNA量の二重染色による同時定量的解析

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9162">http://hdl.handle.net/2297/9162</a>

# 原発性肺癌切除例における肺癌細胞の腫瘍内多様性に関する研究

## —増殖細胞核抗原と核 DNA 量の二重染色による同時定量的解析—

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

森 田 克 哉

原発性肺癌の細胞増殖能を客観的に評価し、腫瘍内多様性 (heterogeneity) を検索することを目的として、切除肺癌材料について増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) と核 DNA 量を二重染色にて同時定量的に解析した。手術的に採取された原発性肺癌症例96例の新鮮切除標本の最大断面で複数部位サンプルを採取して細胞を単離後フローサイトメーターの試料とし、これに抗 PCNA 抗体 (PC10) を反応させた後、蛍光イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識二次抗体 (F313), よう化プロピジウムを加え、PCNA と核 DNA の同時二重蛍光染色を施し、フローサイトメーターで解析した。DNA 指標 (DNA index, DI)=1.0 の  $G_0G_1$  の細胞群を二倍体 (diploid) 細胞群とし、 $DI \geq 1.1$  の  $G_0G_1$  の細胞群を異数倍体 (aneuploid) 細胞群とし、それぞれの細胞群においても PCNA 標識率 (PCNA labeling index, PCNA LI) を算出した。異数倍体細胞群の PCNA LI (40.4±22.7%) は二倍体細胞群の PCNA LI (15.9±11.2%) に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。異数倍体細胞群において DI と PCNA LI とには相関を認めなかった。腺癌では異数倍体細胞群の占める割合が高くなるにつれて、測定サンプルの PCNA LI が高くなる傾向を認めた。PCNA LI は腺癌では腫瘍中心部と辺縁部とで差を認めなかったが、扁平上皮癌では腫瘍辺縁部で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。核 DNA 量の評価では、1 症例から測定サンプル数が少ないほど DNA 二倍体と判定される割合が多かった。性別、年齢、術後病期、組織型、分化度と PCNA LI の検討ではいずれも有意差を認めなかった。扁平上皮癌では腫瘍径と PCNA LI とは正の相関を認めたが、腺癌では腫瘍径との相関は認めなかった。リンパ節転移の有無と PCNA LI の検討では有意差を認めなかったが、腫瘍径が小さくかつ PCNA LI が高値のもの、すなわち発癌から診断までの期間が短いと考えられるものではリンパ節転移を認めなかった。非小細胞肺癌の治療切除例において予後との関連を検討すると、PCNA LI が高値のものは低値のものに比し予後不良の傾向を認めた。DNA 異数倍体パターンを示したものは DNA 二倍体パターンを示したものに比し有意に予後不良であり ( $p < 0.05$ )、さらに DNA 異数倍体パターンを示したもののうち PCNA LI が高値のものは低値のものに比し有意に予後不良であった ( $p < 0.05$ )。原発性肺癌の細胞増殖能および核 DNA 量の評価に際しては腫瘍内多様性による影響を最小限にするために腫瘍の最大断面から検体を採取することが妥当と思われた。PCNA LI は腫瘍増殖の動的状態を反映すると考えられ、癌のある時点での進行度を表す原発腫瘍、所属リンパ節、遠隔転移 (T-Primary Tumor, N-Regional Lymph Nodes, M-Distant Metastasis, TNM) 分類とは独立した予後因子であることが示唆された。

**Key words** lung cancer, flow cytometry, proliferating cell nuclear antigen, cellular DNA content, heterogeneity

原発性肺癌症例は年々増加の傾向にあり、男性では全癌死亡中第1位を占めるに至っている<sup>1)</sup>。しかし肺癌は発見時にはすでに進行しているものが多く、外科的切除、化学療法、放射線療法さらには免疫療法などの集学的治療が試みられているにも関わらず、その予後は不良である。最も良好な成績が期待されるI期例でも、その5年生存率は60~70%とけっして満足すべき成績ではない<sup>23)</sup>。これは腫瘍の大きさ、リンパ節転移有無、他臓器転移の有無が病期分類の主な因子となっており<sup>4)</sup>、同一病期の中にも細胞生物学的には多様な腫瘍をもつ症例が含まれていることによると考えられる<sup>5)</sup>。

このため最近肺癌の病態や予後と、腫瘍を構成する癌細胞個々の悪性度との関係を検討した報告が多くみられる<sup>6)~14)</sup>。肺癌の生物学的悪性度の指標として、核 DNA や増殖細胞核抗原、プロモデオキシウリジン、Ki-67などの各種増殖関連因子などが注目されている。しかし、肺癌は他の臓器癌に比べて腫瘍細胞の腫瘍内多様性 (heterogeneity) が著しい癌である。従ってそれらの臨床的意義については様々な結果が報告されており、また免疫組織染色の評価方法などの問題が存在し、いまだ一定の見解が得られていない。

本研究では肺癌新鮮切除標本を対象にフローサイトメトリー

平成7年9月5日受付, 平成7年9月27日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; DI, DNA index; FCM, flow cytometry; FITC, fluorescein isothiocyanate; LI, labeling index; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI, propidium iodide; TNM, T-Primary Tumor, N-Regional Lymph Nodes, M-Distant Metastasis

を用いて核 DNA 量と腫瘍増殖能の指標である増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の二重染色による同時定量的解析を行い、腫瘍内多様性の有無に影響されない腫瘍増殖能と核 DNA 量との関連評価、および従来の免疫組織染色では困難であった PCNA 標識率 (PCNA labeling index, PCNA LI) の客観的評価を行った。さらに得られた結果と腫瘍内多様性との関係や臨床病理学的因子との関連について検討した。

対象および方法

1. 対象

1992年10月から1994年3月までに金沢大学医学部第一外科で切除された原発性肺癌症例のうち新鮮標本での検討が可能であった96例を対象とした。年齢は40~80才(平均65.6才)、性別は男性68例、女性28例であった。病理組織型分類では、腺癌46例、扁平上皮癌38例、小細胞癌8例、大細胞癌4例であった。組織分類、手術所見記載法、病期分類(術後病期)は日本肺癌学会取り扱い規約<sup>9)</sup>によった。対照群(正常肺)として、対象群の切除肺から任意に抽出した10例の非癌正常肺部分を用いた。

II. 方法

1. 核 DNA 量と PCNA の同時二重蛍光染色

摘出した手術標本の最大断面で、約 3mm 角の大きさで腫瘍中心部と辺縁部に分け複数部位(2~10個、平均5.3個)から材料を採取した。材料の採取にあたっては血球成分等の正常細胞混入をできる限り少なくするため、採取した腫瘍塊をリン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)で十分に洗浄し、また採取組織周囲に付着する結合組織を取り除き、腫瘍細胞の実質部分を確実に取り出すようにした。得られた材料は直ちに眼科用鉗でペースト状に細切り、70% エタノール(和光, 大阪)で24時間以上固定した。その後 40 $\mu$  のナイロンメッシュ

(NBC 工業, 大阪)を通し、単離遊離細胞を得た。これを 4 $^{\circ}$ C PBS にて 2 回洗浄後、4 $^{\circ}$ C 0.2% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (和光) 加 PBS で遠心洗浄し、0.5% トゥイーン20 (Tween 20) (Sigma, St. Louis, USA), 0.5% BSA, 10% 筋注ヒト $\gamma$ グロブリン(グロブリン-ミドリ)(ミドリ十字, 大阪) 加 PBS 250 $\mu$ l に浮遊させ、5 分間放置後、0.5% トゥイーン20, 0.5% BSA, 10% 筋注ヒト $\gamma$ グロブリン加 PBS で 20 倍に希釈した抗 PCNA マウス IgG 抗体 (PC10) (DAKO, Glostrup, Denmark) 100 $\mu$ l を加え、混和。4 $^{\circ}$ C, 60 分間放置した。0.2% BSA 加 PBS で遠心洗浄し、0.5% トゥイーン20, 0.5% BSA, 10% 筋注ヒト $\gamma$ グロブリン加 PBS 250 $\mu$ l に再浮遊させ、5 分間放置後、0.5% トゥイーン20, 0.5% BSA, 10% 筋注ヒト $\gamma$ グロブリン加 PBS で 50 倍に希釈した蛍光イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識二次抗体 (F313) (DAKO) 100 $\mu$ l を加え、混和、4 $^{\circ}$ C, 30 分間放置、PBS で洗浄後、よう化プロピジウム (propidium iodide, PI) (Hoechst, Frankfurt, Germany) (10 $\mu$ g/ml)/リボスクレアーゼ A (Sigma) (200 $\mu$ g/ml) を加え、室温で 1 時間放置し、4 $^{\circ}$ C で遮光して 1 時間以内にフローサイトメーター (EPICS PROFILE II, COULTER, Miami, USA) にて測定した。

2. フローサイトメーターによる定量的解析

核 DNA 量は DNA 指標 (DNA index, DI) として相対的に評価した。DI の算定には患者末梢血から Ficoll-Conray 法にて分離したリンパ球を内部標準試料として検体の一部に混入し、DNA ヒストグラム上で検体の第 1 ピークチャンネル数 (first peak channel number) をリンパ球の示した第 1 ピークチャンネル数で除した値を DI とした。G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> ピークの変動係数 (coefficient of variation, CV) が 8% 以上の症例は測定不能例として評価対象外とし、DI の差は 0.1 を測定限界<sup>10)</sup> とした。DNA ヒストグラム上で DI が 1.1 以上の G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> ピークが存在する

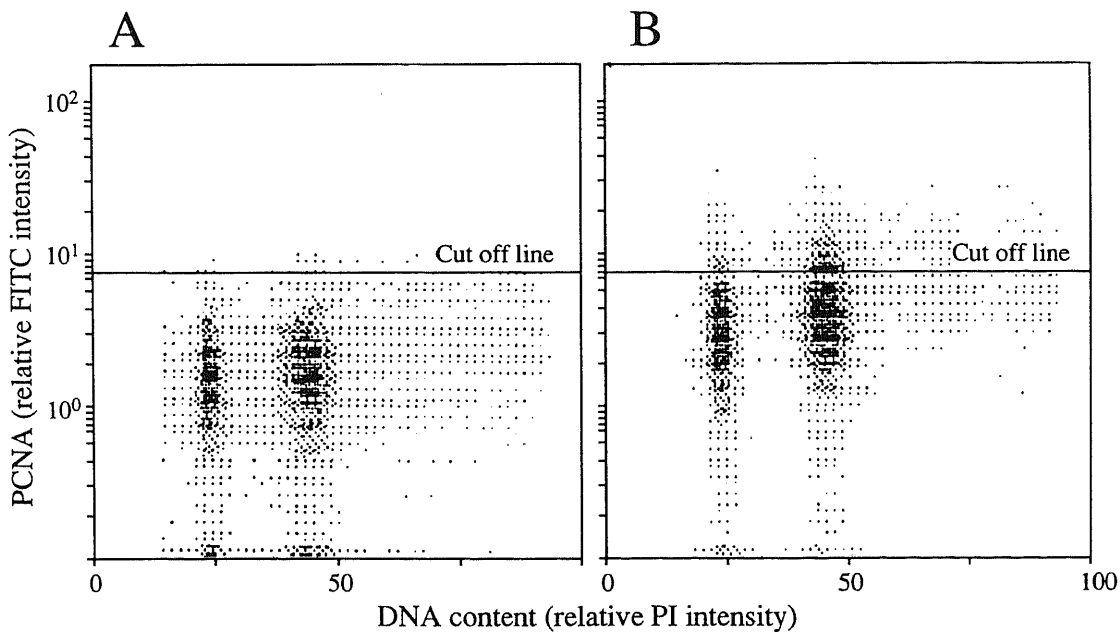


Fig. 1. Quantitative evaluation of DNA content and PCNA using double staining in tumor tissue by flow cytometry. The cut off line was set at the channel number of relative FITC intensity showing the PCNA positive cells were less than 1% in the control study. (A) Control study (anti-PCNA antibody (-)). (B) Anti-PCNA antibody (+). FITC, fluorescein isothiocyanate; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI, propidium iodide.

場合、これを DNA 異数倍体腫瘍 (DNA aneuploidy) とした。

PCNA 陽性細胞は FITC ヒストグラムやカウンターグラフで明瞭に細胞集団が分離できる場合は問題ないが、多くの場合分離が困難であり、一次抗体である抗 PCNA 抗体を加えていない陰性標準測定 (negative control study) を行い、FITC 標識率が 1% 以下となるように遮断線 (cut off line) を定め、それより上を PCNA 陽性細胞とみなした (図 1)。全カウント数に対する陽性細胞数の割合 (%) を PCNA LI とした。DI=1.0 の G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> の細胞群を二倍体細胞群とし、DI $\geq$ 1.1 の G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> の細胞群を異数倍体細胞群とした。また各細胞群の細胞数が全細胞数に占める比率を、それぞれ全細胞数内二倍体細胞数占有率 (% diploid)、全細胞数内異数倍体細胞数占有率 (% aneuploid) とした。

細胞周期と PCNA LI との関係を検討するため、全細胞周期の PCNA LI、および各 DI ごとに G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> の細胞周期を設定し、その細胞群の PCNA LI を算出した。免疫組織化学法で算出した PCNA LI、臨床病理学的因子および生存率とフローサイトメーターで算出した PCNA LI との検討には、症例ごとに測定したすべてのサンプルの全細胞周期の PCNA LI の平均値を算出し、これを対象とした。DNA 倍体パターンと PCNA LI の検討では、すべての測定サンプルの全細胞周期の PCNA LI を対象とし、二倍体細胞群と異数倍体細胞群の PCNA LI の検討では各症例中で全細胞周期の PCNA LI が最も高いサンプルから得た値を対象とした。

### 3. PCNA 免疫組織化学法

フローサイトメーターを用いて評価した PCNA LI と、免疫組織化学的に評価した PCNA LI の比較のため、対象群より任意に抽出した 20 例の癌病巣のパラフィン包埋ブロックを使用した。各症例とも腫瘍全体を十分反映するよう配慮し、腫瘍最大断面全体を反映するパラフィン包埋ブロックを使用した。パラフィン包埋された癌組織を 3 $\mu$ m の厚さに薄切し、0.02% ポリ-L-リジンでスライドに附着させ、100%, 90%, 70%, 45% のエチルアルコールにて各 5 分間脱水し、その後 20 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。次

に、10% ウサギ正常血清 (ニチレイ、東京) を用いてブロッキングを行い、PBS にて洗浄し、抗 PCNA マウス IgG 抗体 (PC10) を蒸留水で 20 倍に希釈し、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。PBS にて 5 分間、3 回洗浄後、ビオチン標識ウサギ抗マウス IgG+IgA+IgM (H+L) (ニチレイ) を用いて室内にて 30 分間反応させ PBS にて 5 分間、3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) で室温にて 30 分間反応させた。PBS にて 5 分間、3 回洗浄後、DAB で室温にて、顕微鏡で発色状態を確認しながら約 3 分間の反応で発色させ、メチルグリーン液 (MERCK, Darmstadt, Germany) にて核染色を行った。最後に、100% キシレンにより、5 分間、3 回の透徹を行った。

### 4. 免疫組織化学染色による PCNA LI の算出

PCNA 免疫組織化学染色陽性の核を定性的に判定した。核は均一あるいは小斑点状に染色された。PCNA LI は顕微鏡下に腫瘍の中心部と辺縁部で偏りのないように視野を選び、癌細胞約 1000 個に対する陽性核数の割合 (%) を算出した。

### 5. 統計学的検討

得られた値はすべて平均値土標準偏差 ( $\bar{x}$   $\pm$  SD) で表した。平均値の有意差検定には 2 群間では検定を用い、3 群間以上では Kruskal-Wallis 検定を用いた。腫瘍中心部と辺縁部の PCNA LI の差の検定には Wilcoxon の符号付順位検定を用いた。離散量に対しては  $\chi^2$  検定を用いた。PCNA LI の高さと同リンパ節転移の頻度の検定には Spearman 順位相関係数の検定を用いた。生存率の検討は背景因子を統一するために、非小細胞肺癌において治療切除<sup>4)</sup>が行われた 48 例のみについて行い、生存率の算出は Kaplan-Meier 法を用い、その有意差検定は一般化 Wilcoxon 法によった。いずれも危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

## 成 績

1. フローサイトメーターで算出した PCNA LI と免疫組織化学染色により算出した PCNA LI との相関  
対象とした 20 例すべてにおいて免疫組織化学染色による

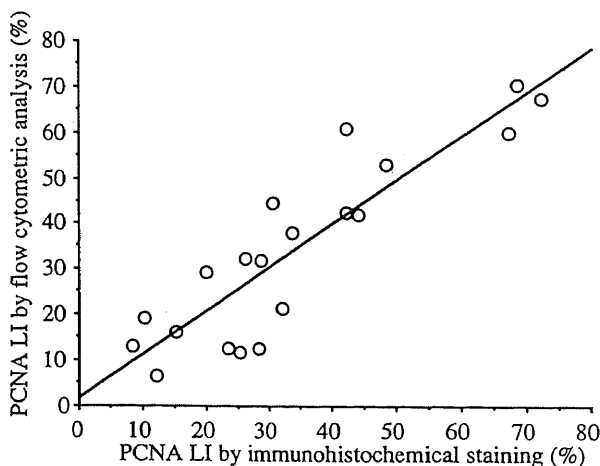


Fig. 2. Correlation between PCNA labeling index (PCNA LI) assayed with flow cytometry and PCNA LI evaluated by immunohistochemical staining. The PCNA LI assayed by flow cytometry is highly correlated with the PCNA LI evaluated by immunohistochemical staining.  $Y=0.957X+1.701$ ,  $r=0.89$ .

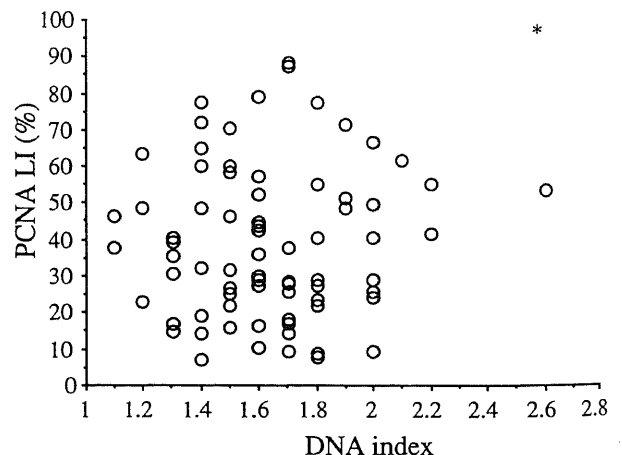


Fig. 3. Correlation between PCNA LI of aneuploid cell population and its DI. There was no correlation between PCNA LI of aneuploid cell population and its DI. \*,  $r=0.05$ , not significant.

PCNA LI の算出は可能であったが、染色の強弱や細胞重なりなどにより判定に苦慮した症例もあった。フローサイトメーターで算出した PCNA LI と免疫組織化学染色により算出した PCNA LI は相関係数0.89の順相関を認めた(図2)。

II. 核 DNA 量とフローサイトメーターで算出した PCNA LI との相関

96症例に対し計329個(1症例につき1~8個, 平均3.4個)のサンプルが測定可能であった。55個のサンプルで DNA 二倍体パターンを認め、その PCNA LI は  $14.2 \pm 9.2\%$  であったのに対し、274個のサンプルで DNA 異数倍体パターンを認め、その PCNA LI は  $28.7 \pm 16.9\%$  と有意に高かった ( $p < 0.01$ )。二倍体細胞群の PCNA LI が  $15.9 \pm 11.2\%$  であるのに対し、異数倍体細胞群は  $40.4 \pm 22.7\%$  と有意に PCNA LI が高かった ( $p < 0.01$ )。異数倍体細胞群において DI と PCNA LI とには相関を認めなかった(図3)。腺癌では全細胞数内異数倍体細胞数占有率(% aneuploid)が高くなるにつれて、測定サンプルの PCNA LI が高くなる傾向を認めた(図4.A)が、扁平上皮癌では全細胞数内異数倍体細胞数占有率と PCNA LI との相関を認めなかった(図4.B)。

III. 腫瘍細胞の核 DNA 量からみた腫瘍内多様性

全測定サンプル329個平均変動係数値は  $5.39 \pm 1.61\%$  であった。96症例中、測定サンプルすべてが DNA 二倍体パターンを示したものは20例(20.8%)で、76例(79.2%)がいずれかの測定サンプル上で DNA 異数倍体パターンを示した。測定サンプル数別では、サンプル数が少ないほど、DNA 二倍体パターンと判定される割合が多かった(表1)。

IV. フローサイトメーターで算出した PCNA LI の腫瘍内多様性

同一腫瘍内で DNA ヒストグラム上は同じ DNA 倍体パターンを示していても、PCNA LI が明らかに異なる症例も認めた(図5)。扁平上皮癌28例、腺癌36例で腫瘍中心部と辺縁部でサンプルが採取可能であった。PCNA LI は腺癌では一定の傾向を認めなかったが(図6.A)、扁平上皮癌では腫瘍辺縁部で有意

に高かった ( $p < 0.05$ ) (図6.B)。

V. フローサイトメーターで算出した PCNA LI と臨床病理学的因子との相関

性別、年齢別(65歳以下, 66歳以上)、術後病期別(I期, II期, IIIA期, IIIB期, IV期)、組織型別(腺癌, 扁平上皮癌, 小細胞癌, 大細胞癌)、分化度別(高分化, 中分化, 低分化)などの臨床病理的背景因子と PCNA LI とについて検討しても有意差を認めなかった(表2)。リンパ節転移の有無別では腺癌46例中リンパ節転移陽性18例の PCNA LI は  $26.8 \pm 13.1\%$ 、リンパ節転移陰性28例の PCNA LI は  $31.6 \pm 19.6\%$  であり、扁平上皮癌38例中リンパ節転移陽性8例の PCNA LI は  $32.9 \pm 16.4\%$ 、リンパ節転移陰性26例の  $28.5 \pm 14.1\%$  でいずれも有意差を認めなかった。また PCNA LI の高さ別におけるリンパ節転移の拡がりについてみても腺癌、扁平上皮癌ともに有意差を認めなかった(表3)。腫瘍径との相関については、腺癌では腫瘍径と PCNA LI とに相関は認めなかったが(図7.A)扁平上皮癌では腫瘍径が増大するに従って PCNA LI は高くなり、正の相関を認めた ( $r = 0.477, p < 0.05$ ) (図7.B)。

腫瘍径ごとの PCNA LI とリンパ節転移の頻度の相関では、

Table 1. Correlation between DNA ploidy pattern of primary tumor and samples used for each measurement

No. of samples obtained from a tumor	No. of tumors examined	No. of tumors showing DNA ploidy pattern of	
		Diploid <sup>a)</sup>	Aneuploid <sup>b)</sup>
1 - 2	32	13	19
3 - 4	45	6	39
5 - 8	19	1	18

a) When all samples examined showed diploid, the tumor was evaluated as diploidy pattern. b) When at least one of samples examined showed aneuploid, the tumor was evaluated as aneuploidy pattern.  $\chi^2$ -value = 11.93,  $p < 0.005$ .

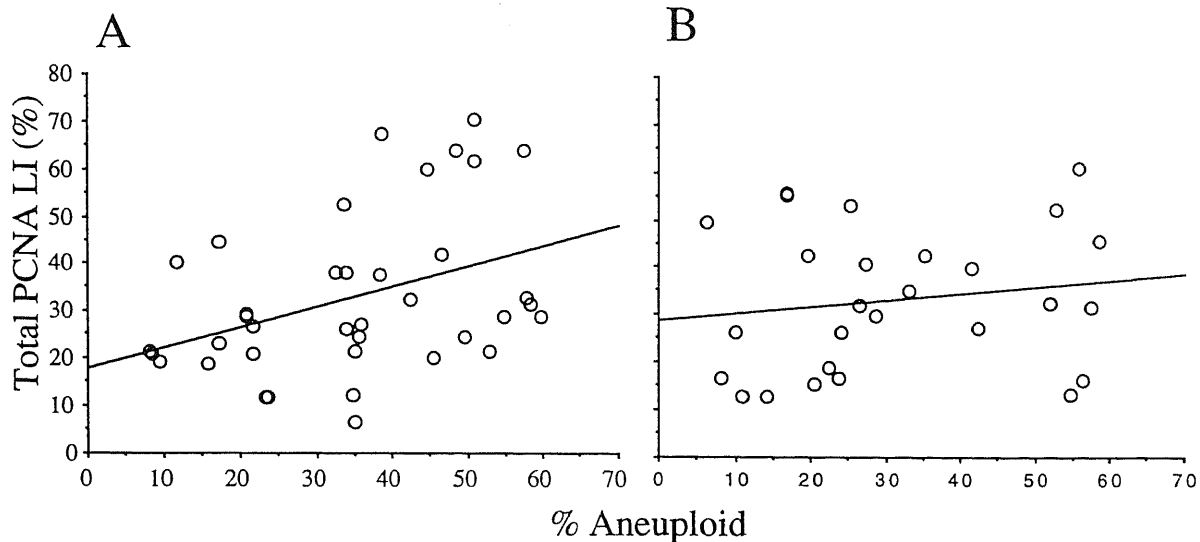


Fig. 4. Correlation between percent aneuploid (% aneuploid) and PCNA LI. (A) Adenocarcinomas. Percent aneuploid (% aneuploid) is correlated to PCNA LI.  $Y = 0.432X + 17.854, r = 0.40, n = 38, p < 0.05$ . (B) Squamous cell carcinomas. There was no correlation between % aneuploid and PCNA LI.  $Y = 0.137X + 29.026, r = 0.16, n = 27$ , not significant. % Aneuploid, the proportion aneuploid cells to all the cells.

腺癌では腫瘍径 30mm 以下では PCNA LI 15% 以下の 7 例中 3 例にリンパ節転移を認め、一方 PCNA LI 45% 以上と高値を示した 5 例すべてに、リンパ節転移は認めなかった。腫瘍径 51mm 以上では PCNA LI 15% 以下の症例は認めず、また PCNA LI 45% 以上と高値を示した 1 例はリンパ節転移を認めた。扁平上皮癌では腫瘍径 30mm 以下で PCNA LI 15% 以

下の 4 例中 1 例にリンパ節転移を認め、腫瘍径 31mm 以上では PCNA LI が高い程リンパ節転移の頻度が増大した (表 4)。

VI. フローサイトメーターで算出した PCNA LI および核 DNA 量と生存率

PCNA LI 35% 未満を低値群、35% 以上を高値群とした。原発巣のうちすべてが DNA 二倍体パターンであったものを D 型とし、少なくともひとつが DNA 異数倍体パターンであったものを A 型とした。治癒切除例 48 例について生存率との相関を検討した。低値群 33 例の 2 年生存率 90.5% に対し、高値群 15 例の 2 年生存率 69.5% と統計学的有意差は認めなかったが高値群で予後不良であった (図 8)。D 型 8 例の 2 年生存率 100% であったのに対し、A 型 40 例の 2 年生存率 76.3% と A 型で有意に予後不良であった ( $p < 0.05$ ) (図 9)。さらに A 型を低値群、高値

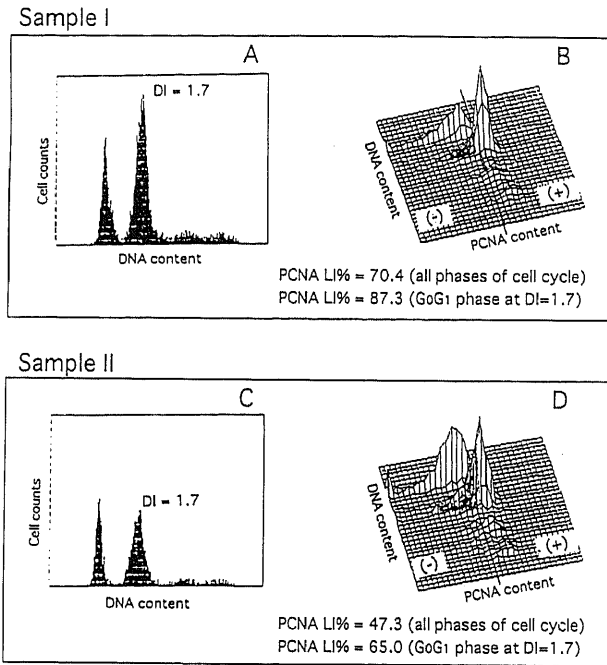


Fig. 5. A case of adenocarcinoma with a intratumoral heterogeneity. The case was a 61-year-old female and the pathological stage was pT1NoMo. In this case, the DNA content and PCNA LI were evaluated at multiple samples taken from another parts. Sample I was one of samples obtained and sample II was another sample obtained. DNA histograms (A and C) showed the same ploidy pattern in sample I and sample II, but PCNA LI (B and D) clarified the intratumoral heterogeneity.

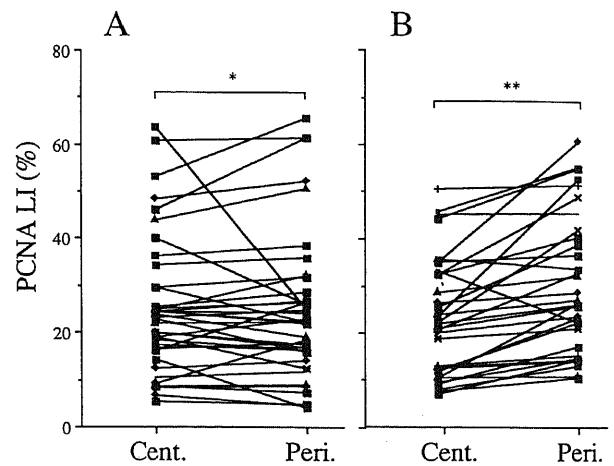


Fig. 6. Relationship of PCNA LI between center and periphery of tumor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. (A) Adenocarcinoma. There was no relationship between PCNA LI and the site of tumor. \*, not significant. (B) Squamous cell carcinoma. PCNA LI was significantly higher at the periphery of the tumor than at its center. \*\*,  $p < 0.05$ . Cent; center, Peri; periphery.

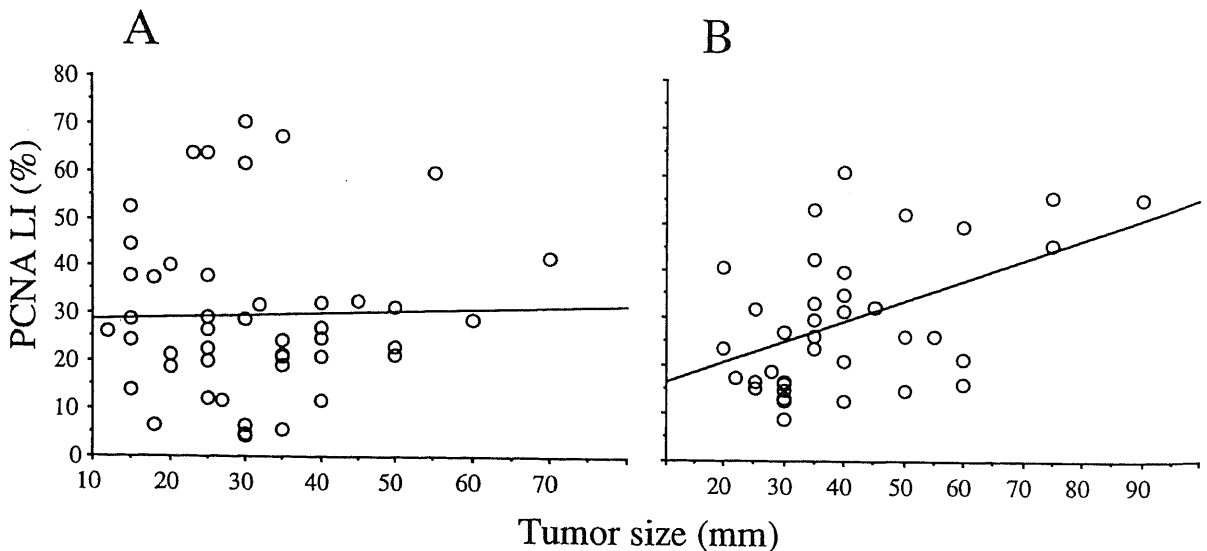


Fig. 7. Correlation between PCNA LI and tumor size. (A) Adenocarcinoma. There was no correlation between the PCNA LI and the tumor size.  $Y = 0.044X + 28.356$ ,  $r = 0.03$ , not significant. (B) Squamous cell carcinoma. The PCNA LI is correlated to the tumor size.  $Y = 0.431X + 12.105$ ,  $r = 0.48$ ,  $p < 0.05$ .

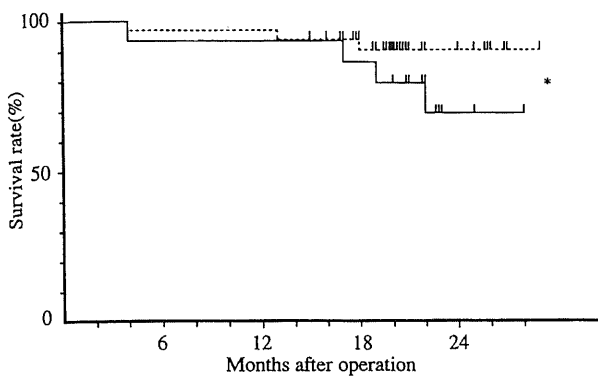


Fig. 8. Survival curves of patients with curatively resected non-small cell lung cancer divided into low PCNA LI (<35%) and high PCNA LI groups (≥35%). ·····, low PCNA LI groups (n=33); —, high PCNA LI groups (n=15). \*, not significant by generalized Wilcoxon test.

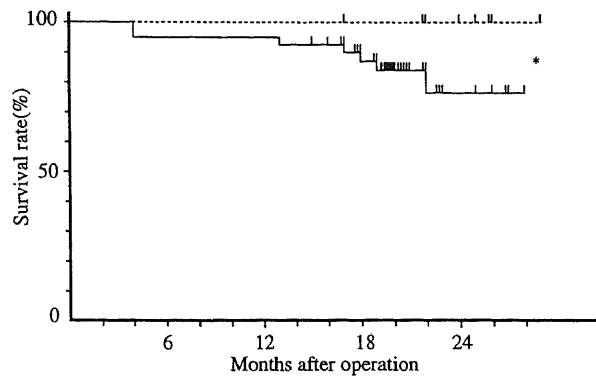


Fig. 9. Survival curves of patients with curatively resected non-small cell lung cancer divided into DNA diploidy patterns and DNA aneuploidy patterns. ·····, cases with diploidy pattern (n=8); —, cases with aneuploidy pattern (n=40). \*, p<0.05 by generalized Wilcoxon test.

Table 2. Correlation between clinicopathological factors and PCNA labeling index in 96 lung cancer cases

Clinicopathological factors		No. of cases	PCNA LI (%)	
Sex	Male	68	30.8±16.7	N.S.*
	Female	28	28.8±16.7	
Age	<65	44	30.9±18.3	N.S.*
	66-	52	29.7±15.2	
Stage	I	48	31.1±18.1	N.S.**
	II	5	22.3±14.9	
	III A	31	30.0±16.0	
	III B	8	30.3±11.4	
	IV	4	31.6±17.3	
Histology	Adeno.	46	29.7±17.3	N.S.**
	Sq.	38	29.5±14.5	
	Large	4	42.9± 3.7	
	Small	8	30.8±24.5	
Differentiation	Well	23	34.8±20.0	N.S.**
	Moderate	47	26.2±12.5	
	Poor	14	32.3±17.8	

Histological type: Adeno., adenocarcinoma; Sq., squamous cell carcinoma; Large, large cell carcinoma; Small, small cell carcinoma. \*Mann-Whitney U test. \*\*Kruskal-Wallis test. N.S., not significant.

Table 3. PCNA LI and frequency of lymph node metastasis

Histology of lung cancer	PCNA LI (%)	No. of cases tested	No. (%) of cases showing	
			n0	n1 or n2
Adenoca.	0-15	9	5 (55.6)	4 (44.4) N.S.*
	15-45	30	17 (56.7)	13 (43.3)
	45-	7	6 (85.7)	1 (14.3)
Sq.	0-15	6	5 (83.3)	1 (16.7) N.S.*
	15-45	25	21 (84.0)	4 (16.0)
	45-	7	4 (57.1)	3 (42.9)

Adenoca., adenocarcinoma; Sq., squamous cell carcinoma. n0, no regional lymph node metastasis; n1, metastasis in the ipsilateral hilar regions; n2, metastasis in the mediastinum. \*Chi-square test. N.S., not significant.

Table 4. Frequency of lymph node metastasis in relation to tumor size and PCNA LI

Histology of lung cancer	Tumor size (mm)	No. of cases tested	Presence of lymph node metastasis	No. (%) of cases showing PCNA LI (%) of			
				0-15	15-45	45-	
Adenoca.	0-30	27	+	3 (42.9)	6 (40.0)	0	N. S.*
			-	4	9	5	
	31-50	16	+	1 (50.0)	6 (46.2)	0	N. S.*
-	1	7	1				
Sq.	0-30	14	+	1 (25.0)	2 (20.0)	-	N. S.*
			-	3	8	-	
	31-50	17	+	0	1 (8.3)	1 (33.3)	N. S.*
-	2	11	2				
Sq.	51-	7	+	-	1 (33.3)	2 (50.0)	N. S.*
			-	-	2	2	

a) +, lymph node metastasis-positive. b) -, lymph node metastasis-negative. Adenoca., adenocarcinoma; Sq., squamous cell carcinoma. \*Spearman rank correlation test. N. S., not significant.

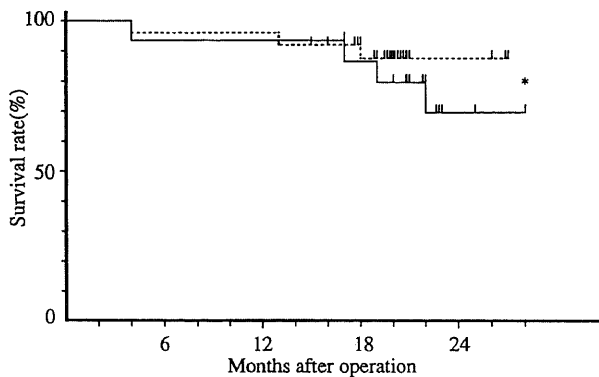


Fig. 10. Survival curves of patients with curatively resected non-small cell lung cancer divided into low PCNA LI (<35%) and high PCNA LI groups ( $\geq 35\%$ ). ..... cases with aneuploidy pattern and low PCNA LI (n=25); —, cases with aneuploidy pattern and high PCNA LI (n=15). \*,  $p < 0.05$  by generalized Wilcoxon test.

群に分け検討するとA型40例中、低値群は25例で2年生存率は87.4%であり、高値群は15例で2年生存率は69.5%であり、A型高値群はA型低値群に比し有意に予後不良であった ( $p < 0.05$ ) (図10).

### 考 察

肺癌は各種臓器癌の中でもっとも多様性、多面性の高い癌腫のひとつと考えられ、その発生母地や組織型、分化度により様々な形態を示すことが指摘されている<sup>16)17)</sup>。そのため、肺癌の進行度を一時点で断面的にみている原発腫瘍、所属リンパ節、遠隔転移 (T-Primary Tumor, N-Regional Lymph Nodes, M-Distant Metastasis, TNM) 分類<sup>1)</sup>のみでは十分といえず<sup>17)</sup>、個々の腫瘍の動的状態を反映すると考えられる増殖能や転移能が注目されるようになってきた。

腫瘍の生物学的悪性度を示すものとして核 DNA 量が測定さ

れ、その予後因子としての有用性に関して現在までに多くの報告<sup>5)19)~23)</sup>がなされている。教室の林<sup>23)</sup>はフローサイトメーターを用いて肺癌の核 DNA 量を測定し、予後との相関について検討を行い、核 DNA 量の予後因子としての有用性を報告している。しかし一方では核 DNA 量は予後因子として重要でないという報告<sup>7)24)25)</sup>もある。このように核 DNA 量について報告者により異なる原因として、測定試料の条件に差異があるという点<sup>7)</sup>、さらに腫瘍内多様性が存在するという点<sup>26)~28)</sup>が考えられ、核 DNA 量について検討する場合この問題点を明らかにする必要がある。

また腫瘍の増殖能の点から肺癌の生物学的悪性度を検討するために、種々の増殖関連抗原に対するモノクローナル抗体を用いて検討が行われ報告されている。増殖関連抗原のうちパラフィン包埋の状態でも染色が可能<sup>29)</sup>な PCNA が注目されており、臨床病理学的因子や予後との相関について研究がなされている。教室の家接<sup>30)</sup>は、パラフィン包埋された肺癌にたいし PCNA の免疫組織化学染色を行い、標識率の高いもので予後不良であったと報告している。しかし PCNA の免疫組織化学染色も核 DNA 量と同様に試料の固定条件の違い<sup>31)</sup>や、増殖能の点での腫瘍内多様性の存在<sup>32)33)</sup>、さらに陽性細胞の評価方法について客観的な基準を決定するのが困難<sup>34)</sup>という問題がある。

以上の問題点を明らかにするためには、腫瘍細胞より出来るだけ多くのサンプルを採取し、かつ各種増殖関連因子の陽性率を客観的に評価する必要がある。本研究では、フローサイトメーターを用いた核 DNA 量と PCNA LI の同時定量解析により細胞周期と増殖関連抗原との関係を明らかにし、またこれにより増殖関連因子の客観的な評価を行った。さらに標本の系統的な多数サンプリングを行うことにより腫瘍内多様性について検討した。

フローサイトメーターで算出した PCNA LI と従来用いられてきた免疫組織化学染色により算出した PCNA LI の相関は比較的良好であったが、免疫組織化学染色においては PCNA の陽性と陰性の判定に苦慮することがしばしばあり、判定の客観性、再現性に問題があった。一方フローサイトメーターによる



PCNA の測定は客観性、再現性があり、さらに多数の細胞を簡単に測定でき、定量性があるなどの点において免疫組織化学的方法よりすぐれていた。

核 DNA 量、特に DNA 倍体パターンは新しい予後因子として注目されているが DNA 倍体パターンの生物学的意義についてはいまだ不明な点が少ない<sup>36)</sup>。核 DNA 量と腫瘍増殖能の関連について検討された報告はあるが、そこで用いられている細胞増殖能の評価方法にはそれぞれ一長一短がある。すなわちフローサイトメーターを用いた S 期細胞比率の測定は、DNA 二倍体パターンを示す腫瘍の場合は比較的正確に測定サンプルの S 期細胞比率が測定可能であるが、DNA 異数倍体パターンや複数倍体パターンを示す腫瘍の場合、S 期細胞比率の測定が困難である<sup>36)</sup>。一方各種増殖関連因子に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色は、細胞の形態学的変化も観察できるが、すでに述べたように多数の細胞を観察しその陽性率の定量的な解析を行うことは困難であり、また DNA 倍体パターンとの相関については肺癌のように腫瘍内多様性の高い腫瘍では検討不能である。この点、本研究で用いたフローサイトメーターによる核 DNA 量と PCNA の同時定量的解析は、DNA 倍体パターンと細胞増殖能の相関を解明するのに適切な方法であると言える。

PCNA LI は、DNA 異数倍体パターン、腫瘍組織での DNA 二倍体パターン、正常肺組織の順に高値を示し、DNA 異数倍体パターンを示す腫瘍組織は増殖能が高く、また DNA 二倍体パターンを示しているも、腫瘍組織では正常肺組織に比し増殖能が高まっていることが明かにされた。DNA 異数倍体パターンを示す腫瘍の多くでは、DI=1.0の細胞周期を示す細胞群を含めて2つ以上の異なった細胞周期を示す細胞群を認めるが、それぞれの細胞群の増殖能を知ることにより、DNA 異数倍体パターンの示す様々なパターンの生物学的意義をより詳細に解明できると考えられる。

DNA 倍体パターンに関する多くの報告では、DNA 異数倍体パターンで DI=1.0の細胞周期を示す細胞群は、腫瘍内に介在する正常細胞として取り扱われる場合が多いが、今回の検討により DI=1.0の細胞周期を示す細胞群も増殖能が高い細胞で占められ、腫瘍細胞が多いことが示唆された。異数倍体細胞群の DI と PCNA LI には相関を認めず、DI>1.0の場合 DI の意義は増殖能の面では不明であった。DI と臨床病理学的な関連を示唆する報告<sup>37)</sup>もあり、今後核 DNA 量の意義を明らかにするためには、細胞増殖能以外の因子との関連も検討する必要がある。

DNA 異数倍体パターンの示す様々なパターンと、細胞増殖能とに何らかの相関があれば、DNA ヒストグラムだけで細胞増殖能が推定可能となる。今回の検討では DNA 異数倍体パターンの示す様々なパターンのうち、それぞれの細胞群の細胞数が全細胞数に占める割合 (% diploid, % aneuploid) に注目し、PCNA LI との相関について検討した。扁平上皮癌では有意な相関を認めなかったものの、腺癌では DNA ヒストグラム上で全細胞数内異数倍体細胞数占率 (% aneuploid) が高いほどその測定サンプル全体の増殖能が高くなる傾向を認めたことから、腺癌では異数倍体細胞群の多寡が腫瘍悪性度を示す因子となりえるものと考えられた。

核 DNA 量の腫瘍内多様性が存在する腫瘍の DNA 倍体パターンを決定する際には、G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期の細胞群の比率を常に考慮す

べきである。すなわち同一の腫瘍でも測定部位により G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期の細胞群の占める割合が異なり、結果的には相対的に多い細胞群が DNA ヒストグラム上で G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期のピークとして認識されるものと思われる。このためある適当な一部分の測定により、腫瘍全体の核 DNA 量を評価するのは困難であり、これを解決するためには腫瘍全体を測定対象とすることが理想的と考えられるが、それは不可能である。現実的には最大断面にて腫瘍を薄切しこれを一括して測定するか、あるいは腫瘍の異なる部位から複数部位サンプルを採取しこれらを均等に混合して測定する<sup>38)</sup> ことでおおよそ腫瘍全体を反映した結果が得られるものと思われる。林<sup>29)</sup>も腫瘍最大断面を構成するパラフィン包埋切片を用いて核 DNA 量を一括測定し、そのサンプリング法の妥当性について報告している。

固形腫瘍をフローサイトメーターで測定する際に、測定試料中の正常細胞の混入率が問題となる。DNA 倍体パターンで DNA 異数倍体パターンを示し、かつその DNA 異数倍体を示す細胞群が全体に占める割合が圧倒的に多い場合は、正常細胞の測定値に与える影響は少ないと考えられる。しかし DNA 倍体パターンで DNA 二倍体パターンを示すとき、あるいは DNA 異数倍体パターンを示してはいるが、その DNA 異数倍体を示す細胞群が全体に占める割合が少ない場合は、正常細胞の混入による影響が無視できないと考えられる。

今回の検討では、免疫組織化学染色により評価した PCNA LI と、フローサイトメーターで評価した PCNA LI は強い順相関を認めたが、免疫組織化学染色で評価した PCNA LI の方が高い値を示した。これはフローサイトメーターの測定試料中には PCNA LI が低い正常細胞が混入しているためと考えられる。現時点で完全に正常細胞の影響のない客観的な PCNA LI の評価をするためには、イメージサイトメトリーなどを用いる方法があるが、今後検討したい。

増殖能での腫瘍内多様性について検討するため、本研究では腫瘍内のサンプル採取部位を中心部と辺縁部に分け、PCNA LI を測定した。その結果、扁平上皮癌では辺縁部で PCNA LI が高いという結果が得られた。腺癌では中心部と辺縁部の比較では PCNA LI の差こそ認めなかったが、PCNA LI は決して均一ではないことが判明した。腫瘍の PCNA LI を評価する際に、腫瘍全体の平均の PCNA LI が重要なのか、あるいは腫瘍内で最も高い PCNA LI を示す部位が重要なのかということが問題となる。腫瘍の局所の増殖速度という面では平均の PCNA LI が重要なのではないかと考えられるが、癌の再発や転移などという点で考えると、一部の PCNA LI が高い部位、すなわち増殖活性の高い細胞集団も無視できないのではないかとと思われる。

以上のように PCNA は同一組織内でも腫瘍内多様性が存在するため、今回の臨床病理学的因子および生存率と PCNA LI の検討には、複数部位から採取した材料の標識率平均値を用いることにより、個々の症例の PCNA LI を評価した。非小細胞肺癌では腫瘍径の増大にしがたがってリンパ節転移陽性例の頻度が増す傾向があり、予後も不良となる<sup>39)</sup>。腫瘍径の大きいものはその時点で癌が進行しているものが多いため、リンパ節転移の頻度も高くなる考えられる。本研究においては PCNA LI とリンパ節転移の頻度には相関を認めず、また腺癌においては PCNA LI と腫瘍径との相関も認めなかった。PCNA LI は腫瘍の動的状態を示す増殖能を表しており、腫瘍径やリンパ節転

移の有無など、癌のある時点の進行度とは独立した因子であることが示された。一方、扁平上皮癌では腫瘍径と PCNA LI とに正の相関を認めたが、これは扁平上皮癌の生物学的な特性なのか、または症例のサンプリング法（たとえば末梢型か肺門型かで癌の発癌から発見までの期間が異なると考えられる）のためなのかについては今回の検討では不明であった。

胃癌継代培養株<sup>40</sup>や白血病細胞<sup>41</sup>などを用いた研究では PCNA LI と、腫瘍倍加時間 (tumor doubling time) とは負の相関を示し、このことから PCNA LI と腫瘍径から、発癌から診断までの期間が相対的に評価可能と考えられる。今回の研究では腺癌では腫瘍径が小さくかつ PCNA LI が高値のもの、すなわち発癌から診断までの期間が短いと考えられるものではリンパ節転移を認めなかった。また腺癌、扁平上皮癌ともに腫瘍径が小さくても、PCNA LI が低値のものでリンパ節転移陽性例を認めたが、これらは発癌から診断までの期間が長いと考えられた。以上の結果は、発癌から診断までの期間とリンパ節転移発生との関連を示唆するものとして興味深い。

PCNA LI および核 DNA 量と生存率との検討に際しては、比較的背景因子を揃えるため I, II, III 期の治癒切除例のみについて生存率を算出した。最長 29 ヶ月の追跡調査が行われ、PCNA LI が低く、かつ DNA 二倍体パターンを示したものは、PCNA LI が高く、かつ DNA 異数倍体パターンを示したものに比し有意に予後良好であった。また DNA 異数倍体パターンを示した症例のなかでも、PCNA LI が高値のものは低値のものに比し有意に予後不良であった。このことから DNA 倍体パターンと PCNA LI を同時に測定し、特に DNA 異数倍体パターンを示したものを PCNA LI の高低で分け評価することは予後を予測するうえで極めて有用であると考えられた。さらに本研究では予後がまだ明らかでない手術時の新鮮標本を用いて PCNA LI と核 DNA 量を測定し、予後因子としての有用性が確認できた点も特記すべきである。

TNM 分類<sup>4</sup>上同一の場合でも、PCNA LI が高値のものは潜在的な浸潤能、転移能は高く<sup>42-44</sup>予後不良と考えられ、PCNA LI と核 DNA を同時測定は、肺癌の予後推定や適切な術後併用療法の決定など肺癌診療に大いに貢献するものと期待される。

## 結 論

原発性肺癌症例 96 例を対象に、肺癌腫瘍の腫瘍内多様性を検索する目的でフローサイトメトリー法を用いて腫瘍細胞の PCNA LI および核 DNA 量を同時定量的に測定し、以下の結論を得た。

1. 96 症例に対し 1 症例につき平均 3.4 個のサンプルが採取、測定可能であった。

2. PCNA LI は免疫組織化学染色から算出したものと、フローサイトメーターから算出したものとはよく相関したが、フローサイトメーターから算出したものがより正確であった。

3. 異数倍体細胞群の PCNA LI (40.4 ± 22.7%) は二倍体細胞群の PCNA LI (15.9 ± 11.2%) に比し有意に高かった。

4. 異数倍体細胞群において DI と PCNA LI とには相関を認めず、DI の意義は増殖能の点では不明であった。

5. 腺癌では全細胞数内異数倍体細胞数占有率 (% aneuploid) が高くなるにつれて、測定サンプルの PCNA LI が高くなる傾向を認めた。

6. PCNA LI, 核 DNA 量共に腫瘍内多様性を認め、腫瘍の最大剖面から検体を採取することが妥当と思われた。

7. 性別、年齢、術後病期、組織型、分化度、リンパ節転移の有無と PCNA LI にはいずれも有意差を認めなかった。扁平上皮癌では腫瘍径と PCNA LI とは正の相関を認めた。

8. 生存率の検討では、PCNA LI 高値のもので予後不良であり、DNA 倍体パターン別に検討した場合においても、DNA 異数倍体パターンで PCNA LI 高値のものは低値のものに比し有意に予後不良であった。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、始終、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、直接の御指導、御教示を頂きました林 義信博士に深謝いたします。さらに本研究の遂行に際し御助言、御協力を頂きました第一外科学教室肺グループの諸先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は第 46 回日本胸部外科学会総会 (1993, 札幌)、第 34 回日本肺癌学会総会 (1993, 東京)、第 11 回日本呼吸器外科学会総会 (1994, 京都)、第 12 回癌 DNA 研究会 (1994, 福井)、第 35 回日本肺癌学会総会 (1994, 長崎) において発表した。

## 文 献

- 1) 富永祐民: 日本人の肺癌増加を考える. 総合臨床, 43, 1461-1463 (1994).
- 2) 渡辺洋宇, 佐藤日出夫, 飯田茂穂, 小林弘明, 木元春生, 市橋 匠, 清水淳三, 村上眞也, 岩 喬: 肺癌長期生存例の臨床背景因子の検討による外科療法の再評価. 日胸外会誌, 37, 878-879 (1989).
- 3) 大田満夫: 肺癌治療における日本の現状. 手術, 44, 1345-1351 (1990).
- 4) 日本肺癌学会編: 臨床・病理, 肺癌取扱規約. 改訂第 3 版, 15-115 頁, 金原出版, 東京, 1990.
- 5) 渡辺洋宇: 肺癌の予後因子. 日胸, 54, 535-546 (1995).
- 6) Pence, J. C., Kerns, B. J., Dodge, R. K. & Iglehart, J. D.: Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small-cell lung cancer. Arch. Surg., 128, 1382-90 (1993).
- 7) Rice, T. W., Bauer, T. W., Gephardt, G. N., Medendorp, S. V., McLain, D. A. & Kirby, T. J.: Prognostic significance of flow cytometry in non-small-cell lung cancer. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 106, 210-217 (1993).
- 8) Liewald, F., Hatz, R., Storck, M., Orend, K. H., Weiss, M., Wulf, G., Valet, G. & Sunder-Plassmann, L.: Prognostic value of deoxyribonucleic acid aneuploidy in primary non-small-cell lung carcinomas and their metastases. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 104, 1476-1482 (1992).
- 9) Ishida, T., Kaneko, S., Akazawa, K., Tateishi, M., Sugio, K. & Sugimachi, K.: Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. Cancer Res., 53, 5000-5003 (1993).
- 10) Casson, A. G., McCuaig, S., Craig, I., Ayed, A., Incelet, R., Kerkvliet, N. & O'Malley, F.: Prognostic value and clinicopathologic correlation of p53 gene mutations

- and nuclear DNA content in human lung cancer: a prospective study. *J. Surg. Oncol.*, **56**, 13-20 (1994).
- 11) Ebina, M., Steinberg, S. M., Mulshine, J. L. & Linnoila, R. I.: Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **54**, 2496-2503 (1994).
- 12) Silini, E. M., Bosi, F., Pellegata, N. S., Volpato, G., Romano, A., Nazari, S. & Tinelli, C.: K-ras gene mutations: an unfavorable prognostic marker in stage I lung adenocarcinoma. *Virchows Arch.*, **424**, 367-373 (1994).
- 13) Kern, J. A., Slebos, R. J., Top, B., Rodenhuis, S., Lager, D., Robinson, R. A., Weiner, D. & Schwartz, D. A.: C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.*, **93**, 516-520 (1994).
- 14) Scagliotti, G. V., Micela, M., Gubetta, L., Leonardo, E., Cappia, S., Borasio, P. & Pozzi, E.: Prognostic significance of Ki67 labelling in resected non small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer*, **29A**, 363-365 (1993).
- 15) 佐々木功典, 黒瀬 顕, 石田陽治, 村上知之: フローサイトメトリーを用いた最近の臨床応用. *Cytometry Reserch*, **3** (suppl), s27-s30 (1993).
- 16) 児玉哲郎: 病理学的にみた肺癌の多様性と予後. 癌と化学療法, **12**, 45-53 (1985).
- 17) 君塚五郎, 林 豊: 肺癌の病理組織学的検討. 肺癌, **19**, 167-176 (1979).
- 18) Ichinose, Y., Hara, N., Ohta, M., Yano, T., Maeda, K., Asoh, H. & Katsuda, Y.: Is T factor of the TNM staging system a predominant prognostic factor in pathologic stage I non-small-cell lung cancer? A multivariate prognostic factor analysis of 151 patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **106**, 90-94 (1993).
- 19) Volm, M., Hahn, E. W., Mattern, J., Muller, T., Vogt-Moykopf, I. & Weber, E.: Five-year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, **48**, 2923-2928 (1988).
- 20) Isobe, H., Miyamoto, H., Shimizu, T., Haneda, H., Hashimoto, M., Inoue, K., Mizuno, S. & Kawakami, Y.: Prognostic and therapeutic significance of flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung cancer. *Cancer*, **65**, 1391-1395 (1990).
- 21) Tirindelli-Danesi, D., Teodori, L., Mauro, F., Modini, C., Botti, C., Cicconetti, F. & Stipa, S.: Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. *Cancer*, **60**, 844-851 (1987).
- 22) Volm, M., Drings, P., Mattern, J., Sonka, J., Vogt-Moykopf, I. & Wayss, K.: Prognostic significance of DNA patterns and resistancepredictive test in non-small cell lung carcinoma. *Cancer*, **56**, 1396-1403 (1985).
- 23) 林 義信: 原発性非小細胞肺癌切除例における核 DNA 量に関する基礎的ならびに臨床的研究. 十全医会誌, **100**, 47-67 (1991).
- 24) Velde, G. P. M., Schutte, B. & Vermelem, A.: Flow cytometric analysis of DNA ploidy level in paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **24**, 455-460 (1988).
- 25) Bunn, P. A., Carney, D. N., Gazdar, A. F., Whang-Pang, J. & Matthews, M. J.: Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res.*, **43**, 5026-5032 (1983).
- 26) Carey, F. A., Lamb, D. & Bird, C. C.: Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer*, **65**, 2266-2269 (1990).
- 27) Volm, M., Mattern, J., Vogt-Schaden, M. & Wayss, K.: Flow cytometric analysis of primary lung carcinomas and their lymph node metastases. *Anticancer Res.*, **7**, 71-76 (1987).
- 28) Teodori, L., Tirindelli-Danesi, D., Mauro, F., De Vita, R., Uccelli, R., Botti, C., Modini, C., Nervi, C. & Stipa, S.: Non-small-cell lung carcinoma, tumor characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity. *Cytometry*, **4**, 174-183 (1983).
- 29) Robbins, B. A., Vega, D. D., Ogata, K., Tan, E. M. & Nakamura, R. M.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 841-845 (1987).
- 30) 家接健一: 原発性非小細胞肺癌における 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).
- 31) 鈴木幸一, 加藤良平, 川生 明: 抗 PCNA モノクローナル抗体による増殖期細胞の同定—ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検討—. 医学のあゆみ, **157**, 655-656 (1991).
- 32) Allegranza, A., Girlando, S., Arrigoni, G. L., Veronese, S. & Mauri, F. A.: Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, **419**, 417-423 (1991).
- 33) Carey, F. A., Fabbroni, G. & Lamb, D.: Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology*, **20**, 499-503 (1993).
- 34) Liden, M. D., Torres, F. X., Kubus, R. J. & Zarbo, R. J.: Clinical application of morphological and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am. J. Clin. Pathol.*, **97**, S4-S13 (1992).
- 35) 田川 泰: 非小細胞肺癌と DNA 量. *Cytometry Research*, **3**, 31-36 (1993).
- 36) Granone, P., Cardillo, G., Rumi, E., D'Ugo, D., Ciletti, S., Margaritora, S. & Terribile, D.: DNA flow cytometric analysis in patients with operable non-small cell lung carcinoma. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.*, **7**, 351-355 (1993).
- 37) Zimmerman, P. V., Hawson, G. A. T., Bint, M. H. & Parsons, P. G.: Ploidy as a prognostic determinant surgically treated lung cancer. *Lancet*, **2**, 530-523 (1987).

- 38) Sam, C. B., Roger, R. P., Mary, E. D., Alice, L. W., Sharon, G. G., Wade, E. B., Paul, K. & Courtney M. T. Jr.: Intratumor variability in prognostic indicators may be the cause of conflicting estimates of patient survival and response to therapy. *Cancer Res.*, 54, 5351-5356 (1994).
- 39) 渡辺洋宇, 林 義信, 高島一郎, 清水淳三, 村上眞也, 森田克哉, 荒能義彦, 野々村昭孝: リンパ節転移の拡がりからみた, 広範囲郭清の必要性. *胸部外科*, 47, 4-9 (1994).
- 40) 高橋 豊, 渡辺秀人, 藤岡 央, 磨伊正義: スードマウス移植ヒト胃癌株における PCNA 染色率と発育速度との相関. *日外会誌*, 93, 1511 (1992).
- 41) Giglio, A., O'Brien, S., Ford, R., Saya, H., Manning, J., Keating, M., Johnston, D., Khetan, R., Naggar, A. & Deisseroth, A.: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in chronic lymphoid leukemia. *Blood*, 79, 2717-2720 (1992).
- 42) 井上博元, 小川純一, 正津 晃: 肺癌における p53 発現と細胞増殖能, 予後との関係. *肺癌*, 34, 153-159 (1994).
- 43) Fontanini, G., Macchiarini, P., Pepe, S., Ruggiero, A., Hardin, M., Bigini, D., Vignati, S., Pingitore, R. & Angeletti, C. A.: The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer*, 15, 1520-1527 (1992).
- 44) Ogawa, J., Sano, A., Koide, S. & Shohtsu, A.: Relation between recurrence and expression of proliferating cell nuclear antigen, sialyl LewisX, and sialyl Lewis(a) in lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 108, 329-336 (1994).

**Clinical and Experimental Studies on the Intratumoral Heterogeneity in Lung Cancer** Katsuya Morita, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 104, 600—610 (1995)

**Key words** lung cancer, flow cytometry, proliferating cell nuclear antigen, cellular DNA content, heterogeneity

#### Abstract

Clinical and experimental studies on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cellular DAN content were conducted to examine the intratumoral heterogeneity in lung cancer by objectively evaluating the PCNA labeling index (PCNA LI). The PCNA LI and the cellular DNA contents were evaluated in single cell suspensions of freshly resected specimens taken from the cut surface of the tumor, at its largest diameter, using a simultaneous double staining technique by flow cytometry (FCM). Monoclonal antibody (PC10) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse IgG were used for staining PCNA, and propidium iodide was used for staining cellular DNA contents. The cells at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle were classified into two categories by the DNA index (DI); diploid cells (DI=1.0) and aneuploid cells (DI>1.0). The PCNA labeling index (LI) was measured at each phase of the cell cycle. PCNA LI of aneuploid cells (40.4±22.7%) was significantly higher than that of diploid cells (15.9±11.2%) ( $p<0.05$ ). There was no correlation between the DI of aneuploid cells and PCNA LI. In adenocarcinomas, the % aneuploid was directly correlated to PCNA LI at all phases. In adenocarcinoma, there was no relationship between PCNA LI and the site of the tumor. However in squamous cell carcinoma, PCNA LI was significantly higher at the periphery of the tumor than at its center ( $p<0.05$ ). The incidence of DNA diploidy tended to decrease when a number of specimens were taken from each tumor. There was no significant correlation between the PCNA LI and sex, age, stage, histological cell type, and tumor cell differentiation. In squamous cell carcinomas, PCNA LI was directly correlated to tumor size, but in adenocarcinomas, there was no correlation between PCNA LI and tumor size. There was no correlation between the frequency of lymphnode metastasis and PCNA LI but there was no lymphnode metastasis when the tumor size was small and the PCNA LI was high, that is, the duration between the canceration and the diagnosis was short. The prognosis was poorer for high PCNA LI than low PCNA LI. Patients with DNA diploidy had significantly higher survival rates than those with DNA aneuploidy ( $p<0.05$ ) and it was found that patients with DNA aneuploidy and high PCNA LI had a significantly poorer prognosis than those with low PCNA LI ( $p<0.05$ ). These findings suggested that tissue samples should be taken from the whole cut surface of the tumor, at its largest diameter, and that PCNA LI did not correlate with other prognostic factors but showed a proliferating potential.