

# 甲状腺腫瘍の核 DNA 量と 生物学的悪性度に関する研究

岡山大学医学部第二外科学教室 (指導: 寺本 滋教授)

小野田 裕 士

(平成 5 年 2 月 18 日受稿)

**Key words:** 甲状腺癌, フローサイトメトリー, 生物学的悪性度,  
プロイディパターン, 増殖期細胞

## 緒 言

従来より腫瘍の良悪性の鑑別, 悪性度の解析は病理組織学的な形態学的検索によって行われてきた。しかし, 一般に予後良好な甲状腺分化癌の中にも, 組織型や組織学的進行度から推測される臨床経過と異なり, 速く進行し不幸な転帰をたどる症例がみられる。また, 形態学的に濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別が困難な症例も存在する。このような点を考慮すると, 甲状腺癌, 特に分化癌の生物学的悪性度を判定する場合, 病理組織学的所見のみでは困難と考えられる。

一方, 近年 Flow cytometry (以下 FCM) による核 DNA 量の測定が種々の腫瘍について行われ, 腫瘍細胞の診断や悪性度などの観点から研究が進められている<sup>1)~9)</sup>。甲状腺腫瘍に関する報告<sup>10)~20)</sup>も散見されるが, 良悪性の鑑別, 予後判定など生物学的悪性度の指標としての有用性に関する結果は必ずしも一定していない。

そこで今回著者は, 甲状腺分化癌の核 DNA 量と生物学的悪性度の関連を知る目的で, 甲状腺分化癌を中心に各種甲状腺腫瘍の核 DNA 量を FCM により測定し, 臨床病理学的諸因子及び予後との関連を検討した。

## 対象と方法

### 1. 対 象

1971年~1991年までに岡山大学医学部第二外科で手術された甲状腺腫瘍初回手術症例のうち 80例を対象とした。甲状腺腫瘍の内訳は, 濾胞

表 1 対 象  
(1971年~1991年)

甲状腺腫瘍初回手術症例	80例
良性	11例
濾胞腺腫	11例
悪性	69例
乳頭癌	42例
濾胞癌	18例
髓様癌	3例
未分化癌	6例

岡山大学第 2 外科

腺腫 11例, 乳頭癌 42例, 濾胞癌 18例, 未分化癌 6例, 髓様癌 3例であった (表 1)。

### 2. 方 法

#### 1) 試料の作製法

試料の作製は切除標本のパラフィン包埋組織を用いて, Schutte らの方法<sup>21)</sup>に準じて行った (表 2)。使用した試薬及び溶液の組成は表 3のとおりである。すなわち, 組織学的に確認された病変部よりミクロトームを用いて 50 $\mu$ m の切片を 5 枚切り出し, これを包埋かごに入れ, キシレンにて 1 時間脱パラフィンを行った。同じ操作を繰り返したのち, キシレンを捨て 100%, 95%, 70% と濃度の異なるエタノールにて各々 30 分間再水和を行った。さらに 3 次蒸留水中で 30 分の再水和を 2 回行ったのち, Vindeløv の stock solution<sup>22)</sup> に溶解した 0.25% trypsin buffer の入った試験管に移した。これを 37 $^{\circ}$ C の water bath 中で, 約 15 時間 over night incubation を行い裸核化し, ボルテックスミキシング後静置し,

表2 パラフィン包埋組織を用いた試料作製法 (Schutte らの方法)

パラフィンブロック	50 $\mu$ mにスライス
↓	
キシレン	1 hr $\times$ 2回
↓	
エタノール	100% 95% 70% 各30mins
↓	
3次蒸留水	30mins $\times$ 2回
↓	
0.25% Trypsin Buffer	3 ml 37 $^{\circ}$ C over-night
↓	
42 $\mu$ mナイロンメッシュ	
↓	
単離細胞浮遊液	
↓	
1200rpm, 5分間遠沈後, 上清を除去	
↓	
DNA 染色 (Vindeløfv の方法)	
solution-A	500 $\mu$ l
↓	室温で10分間
solution-B	500 $\mu$ l
↓	室温で10分間
solution-C	500 $\mu$ l
↓	アイスバス内の暗所で10分間
FACScan flow cytometerにて測定	

42 $\mu$ mのナイロンメッシュを用いて濾過し, 単離細胞浮遊液を得た. DNA 染色は propidium iodide (PI) を用いた Vindeløfv の方法<sup>22)</sup> によって行った. すなわち, 得られた単離細胞浮遊液を1200rpm, 5分間遠沈後, 上清を除去し, solution-A を500 $\mu$ l加え室温で10分間, 更にこれに solution-B を500 $\mu$ l加え室温で10分間, 最後に solution-C を500 $\mu$ l加えアイスバス内の暗所で10分間作用させ PI 染色を行った.

## 2) FCM による測定及び DNA histogram の解析

核 DNA 量の測定には, Becton Dickinson 社製 FACScan Flow cytometer を用い, 一検体あたり  $2 \times 10^4$  個の細胞数を測定した. 測定に際して標準試料を用いて, 変動係数が3%以下となるように機器の調整を行った. なお, 検体に内部標準は加えず, 同一標本内に含まれるリンパ球, 上皮細胞あるいは繊維芽細胞を内部標準として用いた.

DNA histogram の解析は, 変動係数9%以上のものを除いた残りを評価可能とし, G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> 期

表3 試料作製に使用した試薬, 溶液

Stock Solution	2000ml, pH 7.6
CITRIC ACID, Trisodium Salt (SIGMA C-7254)	2000mg (3.4mM)
SPERMINE Tetrahydrochloride (SIGMA S-2876)	1044mg (1.5mM)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (和光純薬)	121mg (0.5mM)
NONIDET P-40 (SIGMA N-3516)	2000 $\mu$ l (0.1%)
3次蒸留水を加えて2000mlとする	
0.25% Trypsin-Buffer	
Trypsin (Difco, 1:250)	250mg
	in 100ml of Stock Solution
Solution-A	
Trypsin (Difco, 1:250)	15mg
	in 500ml of Stock Solution
Solution-B	
Trypsin inhibitor (SIGMA T-9253)	250mg
RIBONUCLEASE A (SIGMA R-5503)	50mg
	in 500ml of Stock Solution
Solution-C	
PROPIDIUM IODIDE (PI) (SIGMA P-4170)	208mg
SPERMINE Tetrahydrochloride	580mg
	in 500ml of Stock Solution

表4 検討項目

1. 背景因子と核 DNA 量
1) 年齢
2) 性別
2. 組織型と核 DNA 量
1) 良悪性
2) 癌の組織型
3. 腫瘍の進行度と核 DNA 量
1) 組織学的腫瘍径 (t)
2) 甲状腺外浸潤の有無 (Ex)
3) 組織学的リンパ節転移の有無 (n)
4) 遠隔転移の有無 (M)
4. 予後と核 DNA 量

に単一のピークを有するものを DNA diploidy (以下 diploidy) とし、二つ以上のピークを有するものを DNA aneuploidy (以下 aneuploidy) とした。さらに、SOBR (Sum of Broaded Rectangles) モデル<sup>23)</sup>を用いて、細胞周期の解析を行い、増殖期細胞の割合として S 期の割合、G<sub>2</sub>M 期の割合及び S+G<sub>2</sub>M 期の割合を算出し、各々 %S, %G<sub>2</sub>M, %S+G<sub>2</sub>M と表現した。

3) 検討項目

検討項目には背景因子、組織型、腫瘍の進行度と予後を用いた。背景因子としては年齢、性別を用い、組織型の検討は良悪性、癌の組織型に分けて検討し、腫瘍の進行度としては組織学的腫瘍径 (t)、甲状腺外浸潤の有無 (Ex)、組織学的リンパ節転移の有無 (n)、遠隔転移の有無 (M) を用いた。これらの検討項目と核 DNA 量の関係を、各々 ploidy pattern 及び細胞周期における増殖期細胞の割合との関連から検討した (表4)。

4) 検討方法

年齢については UICC の分類<sup>24)</sup>に従い、45歳で2群に分けて ploidy pattern による検討及び増殖期細胞の割合の比較を行い、さらに年齢と増殖期細胞の割合との相関も検討した。組織型及び腫瘍の進行度としての組織学的腫瘍径 (t)、甲状腺外浸潤の有無 (Ex)、組織学的リンパ節転移の有無 (n)、遠隔転移の有無 (M) は甲状腺癌取り扱い規約<sup>25)</sup>のそれぞれ組織学的分類、t 分類、Ex 分類、n 分類、M 分類に準じて、

表5 各検討に用いた症例の内訳

		diploidy	aneuploidy
濾胞腺腫	11例	11例	0例
乳頭癌	42例	36例	6例
濾胞癌	18例	15例	3例
髓様癌	3例	3例	0例
未分化癌	6例	0例	6例

□ 組織型以外の項目について検討した症例  
 □ 増殖期細胞の割合について検討した症例

2～4群に分け同様に ploidy pattern、増殖期細胞の割合について検討した。ただし t-number に関しては tis は t1 とともに処理した。Ex に関しては Ex 0 を Ex (-) とし、Ex 1, Ex 2 を Ex (+) と一括して検討した。n に関しても同様に n 0 を n (-), n 1, n 2, n 3 は一括して n (+) として検討した。予後に関しては分化癌における ploidy pattern 別の累積生存率を Kaplan-Meier 法により算出し比較するとともに、再発の徴候なく10年以上生存中の症例を無再発生存例 (乳頭癌10例、濾胞癌1例)、術後5年以内に再発を認めたが、生存中の症例を再発生存例 (乳頭癌7例、濾胞癌3例)、術後5年以内に再発死亡した症例を早期死亡例 (乳頭癌10例、濾胞癌3例) とし、予後により3群に分けて、ploidy pattern 及び増殖期細胞の割合との関係を検討した。

なお、各項目の検討に用いた症例は、背景因子、腫瘍の進行度及び予後に関しては分化癌である乳頭癌と濾胞癌に限定し、組織型の検討においてのみ、良性腫瘍である濾胞腺腫と分化癌以外の未分化癌、髓様癌を加えて検討した。また増殖期細胞の割合との関係の検討には、aneuploidy 症例では細胞周期の解析が困難であったため、diploidy 症例のみを用いた (表5)。

統計学的有意差の検定は、ploidy pattern の検討には  $\chi^2$  検定を用い、増殖期細胞の割合の検討には一元配置法及び t 検定を用いて行った。Kaplan-Meier 法により算出した累積生存率の有意差検定には、generalized Wilcoxon test を用いた。いずれも危険率5%未満をもって有意

差ありと判定した。

結 果

1. 背景因子と核 DNA 量 (表 6, 7)

1) 年 齢

aneuploidy の出現率は、45歳以上の群で16.7% (6/36), 45歳未満の群で12.5% (3/24) であり、両群間に有意差を認めなかった。

増殖期細胞の割合は、45歳以上の群で%S 17.4±13.0, %G<sub>2</sub>M 5.5±3.0, %S+G<sub>2</sub>M 22.9±12.6, 45歳未満の群で%S 8.1±6.2, %G<sub>2</sub>M 6.0±2.9, %S+G<sub>2</sub>M 14.1±6.1で、%S, %S+G<sub>2</sub>M が45歳以上の群で有意に (p<0.01) 高値を示した。%G<sub>2</sub>M は両群間で差を認めなかった。年齢と増殖期細胞の割合との相関をみると、高齢になるほど%S, %S+G<sub>2</sub>M が高くなり、有意な相関 (p<0.001, p<0.005) を認めた (図 1)。%G<sub>2</sub>M は、年齢との間に有意な相関を認めなかった。

2) 性 別

aneuploidy の出現率は男性で20% (2/10),

女性で14% (7/50) であり、男性にやや高い傾向を認めたが、有意ではなかった。

増殖期細胞の割合は、%S, %G<sub>2</sub>M, %S+G<sub>2</sub>M のいずれも男女間に有意差は認められなかった。

2. 組織型と核 DNA 量 (表 8, 9)

1) 良 悪 性

濾胞腺腫症例を良性群とし、癌症例を悪性群として両群の ploidy pattern の検討を行うと、良性群に aneuploidy を示した症例はなく、全例 diploidy を示し、悪性群は69例中15例 (21.7%) に aneuploidy を認めた。良悪性間での aneuploidy の出現率に統計学的有意差は認められなかったが、良性の濾胞腺腫はすべて diploidy であり、aneuploidy を示した症例は全例悪性(癌)であった。

増殖期細胞の割合は、良性群では%S 11.2±10.2, %G<sub>2</sub>M 2.3±1.3, %S+G<sub>2</sub>M 13.5±11.0, 悪性群では%S 13.2±11.4, %G<sub>2</sub>M 5.7±2.9, %S+G<sub>2</sub>M 18.9±11.0であった。良性群に比べ

表 6 背景因子 (年齢・性別) と ploidy pattern の関係

	aneuploidy	diploidy	計	
年 齢				
45歳以上	6 (16.7%)	30 (83.3%)	36	
45歳未満	3 (12.5%)	21 (87.5%)	24	NS
性 別				
男性	2 (20.0%)	8 (80.0%)	10	
女性	7 (14.0%)	43 (86.0%)	50	NS

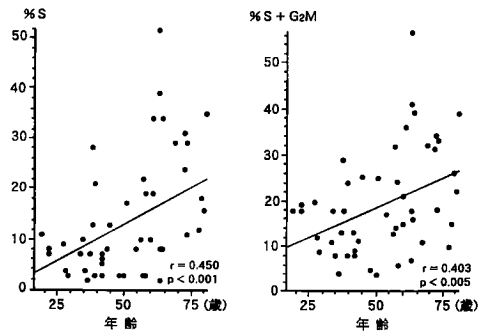


図 1 年齢と増殖期細胞の割合の相関

表 7 背景因子 (年齢・性別) と増殖期細胞の割合の関係

	%S	%G <sub>2</sub> M	%S+G <sub>2</sub> M	
年 齢				
45歳以上 (n=30)	17.4±13.0	5.5±3.0	22.9±12.6	*]
45歳未満 (n=21)	8.1±6.2	6.0±2.9	14.1±6.1	
性 別				
男性 (n=8)	13.2±11.4	7.3±3.8	20.5±9.4	
女性 (n=43)	13.7±11.8	5.4±2.7	19.0±11.6	NS

平均値±標準偏差 \*p<0.01

悪性群の増殖期細胞の割合が高い傾向を認め、%G<sub>2</sub>M は両群間に有意差を認めた (p<0.01).

2) 癌の組織型

未分化癌は全例 aneuploidy であり、以下乳頭癌、濾胞癌、髓様癌の順に aneuploidy の出現率は14.3% (6/42), 16.7% (3/18), 0% (0/3)であった。未分化癌は乳頭癌、濾胞癌、髓様癌のいずれと比べても有意に (p<0.005) aneuploidy の出現率が高かった。乳頭癌、濾胞癌、髓様癌の間では aneuploidy の出現率に有意差を認めなかった。

増殖期細胞の割合は、乳頭癌では、%S 10.8±10.5, %G<sub>2</sub>M 5.6±2.9, %S+G<sub>2</sub>M 16.4±10.6, 濾胞癌では、%S 20.3±11.6, %G<sub>2</sub>M 5.9±3.2, %S+G<sub>2</sub>M 26.2±9.8, 髓様癌では、%S 6.0±1.0, %G<sub>2</sub>M 6.7±0.6, %S+G<sub>2</sub>M 12.7±0.6であり、濾胞癌の%S, %S+G<sub>2</sub>M が乳頭癌、髓様癌に比べ有意に高かった。%G<sub>2</sub>M は、髓様癌にやや高い傾向を認めたが有意差は認めなかった。

表8 組織型と ploidy pattern の関係

	aneuploidy	diploidy	計	
良悪性				
濾胞腺腫	0 (0.0%)	11 (100%)	11	
癌	15 (21.7%)	54 (78.3%)	69	NS
組織型				
乳頭癌	6 (14.3%)	36 (85.7%)	42	p<0.005
濾胞癌	3 (16.7%)	15 (83.3%)	18	
髓様癌	0 (0.0%)	3 (100%)	3	
未分化癌	6 (100%)	0 (0.0%)	6	

表9 組織型と増殖期細胞の割合の関係

	%S	%G <sub>2</sub> M	%S+G <sub>2</sub> M
良悪性			
濾胞腺腫 (n=11)	11.2±10.2	2.3±1.3	13.5±11.0
癌 (n=54)	13.2±11.4	5.7±2.9	18.9±11.0
組織型			
乳頭癌 (n=36)	10.8±10.5	5.6±2.9	16.4±10.6
濾胞癌 (n=15)	20.3±11.6	5.9±3.2	26.2±9.8
髓様癌 (n=3)	6.0±1.0	6.7±0.6	12.7±0.6

平均値±標準偏差 \*p<0.01, \*\*p<0.05

3. 腫瘍の進行度 (表10, 11)

1) 組織学的腫瘍径 (t)

aneuploidy の出現率は t1 群では18.2% (2/11), 以下 t2 群, t3 群, t4 群の順に10.5% (2/19), 0% (0/8), 22.7% (5/22)であった。t3 以下の群に比べ t4 群の aneuploidy の出現率がやや高い傾向を認めたが、有意差は認められなかった。また、t1 群, t2 群, t3 群の中では t1 群の aneuploidy の出現率が最も高く、t3 群には aneuploidy は認められなかった。

増殖期細胞の割合は、t1 群では %S 6.4±3.4, %G<sub>2</sub>M 5.2±3.0, %S+G<sub>2</sub>M 11.7±3.9, t2 群では %S 14.5±9.2, %G<sub>2</sub>M 6.6±3.8, %S+G<sub>2</sub>M 21.1±7.9, t3 群では %S 21.6±15.1, %G<sub>2</sub>M 4.3±2.3, %S+G<sub>2</sub>M 25.9±14.1, t4 群では %S 12.7±13.0, %G<sub>2</sub>M 5.6±1.8, %S+G<sub>2</sub>M 18.3±13.3であり、%S, %S+G<sub>2</sub>M は t1 群が最も低値を示し t2 群, t3 群との間に有意差を認めた。しかし、t1 群と t4 群との間には有意差は認められず、また t4 群の %S, %S+G<sub>2</sub>M は t2 群, t3 群より低値を示し、t-number との間に一定の関連は認められなかった。%G<sub>2</sub>M はいずれの群間にも有意差は認められなかった。

2) 甲状腺外浸潤の有無 (Ex)

aneuploidy の出現率は、Ex (-) 群で10.5% (4/38), Ex (+) 群で22.7% (5/22)と、Ex (+) 群の aneuploidy の出現率が高い傾向を認めたが、有意差は認めなかった。

増殖期細胞の割合は、両群間に差を認めなかった。

## 3) 組織学的リンパ節転移の有無 (n)

aneuploidy の出現率は, n(-) 群で4.8% (1/21), n(+) 群で20.5% (8/39) と, n(+) に aneuploidy の出現率が高い傾向を認めたが, 有意差は認められなかった。

増殖期細胞の割合は, n(-) 群で %S 16.8 ± 10.8, %G<sub>2</sub>M 5.4 ± 3.1, %S+G<sub>2</sub>M 22.2 ± 10.4, n(+) 群で %S 11.5 ± 11.8, %G<sub>2</sub>M 5.8 ± 2.8, %S+G<sub>2</sub>M 17.4 ± 11.5 であり, n(+) 群に比べて n(-) 群の %S, %S+G<sub>2</sub>M がわずかに高か

ったが, いずれも有意差は認められなかった。

## 4) 遠隔転移の有無 (M)

aneuploidy の出現率は, M(-) 群で14.3% (8/56), M(+) 群で25.0% (1/4) と, M(+) 群に aneuploidy の出現率がやや高い傾向を認めたが, 有意差は認められなかった。

増殖期細胞の割合は, M(-) 群で %S 13.9 ± 11.8, %G<sub>2</sub>M 5.6 ± 3.0, %S+G<sub>2</sub>M 19.5 ± 11.3, M(+) 群で %S 8.3 ± 8.5, %G<sub>2</sub>M 6.3 ± 1.5, %S+G<sub>2</sub>M 14.7 ± 10.0 であり, M(+) 群に比べて M(-) 群の %S, %S+G<sub>2</sub>M が高い傾向を認めたが, いずれも有意とは言えなかった。

## 4. 予後と核 DNA 量 (表12, 13)

甲状腺分化癌のみを対象とした ploidy pattern による生存率の比較では, aneuploidy 群の生存率は diploidy 群と比較して有意に (p < 0.0001) 不良であった (図2)。

表10 腫瘍の進行度と ploidy pattern の関係

	aneuploidy	diploidy	計	
組織学的腫瘍径				
t 1	2 (18.2%)	9 (81.8%)	11	
t 2	2 (10.5%)	17 (89.5%)	19	
t 3	0 (0.0%)	8 (100%)	8	
t 4	5 (22.7%)	17 (77.3%)	22	NS
甲状腺外浸潤				
Ex (-)	4 (10.5%)	34 (89.5%)	38	
Ex (+)	5 (22.7%)	17 (77.3%)	22	NS
リンパ節転移				
n (-)	1 (4.8%)	20 (95.2%)	21	
n (+)	8 (20.5%)	31 (79.5%)	39	NS
遠隔転移				
M (-)	8 (14.3%)	48 (85.7%)	56	
M (+)	1 (25.0%)	3 (75.0%)	4	NS

表12 予後と ploidy pattern の関係

	aneuploidy	diploidy	計
無再発生存群	0 (0.0%)	11 (100%)	11
再発生存群	* 1 (10.0%)	9 (90.0%)	10
早期死亡群	7 (53.8%)	6 (46.2%)	13

\* p < 0.005, \*\* p < 0.05

表11 腫瘍の進行度と増殖期細胞の割合の関係

	%S	%G <sub>2</sub> M	%S+G <sub>2</sub> M	
組織学的腫瘍径				
t 1 (n=9)	* $\left[ \begin{array}{l} 6.4 \pm 3.4 \\ 14.5 \pm 9.2 \\ 21.6 \pm 15.1 \end{array} \right]$ **	5.2 ± 3.0	* * $\left[ \begin{array}{l} 11.7 \pm 3.9 \\ 21.1 \pm 7.9 \\ 25.9 \pm 14.1 \end{array} \right]$ *	
t 2 (n=17)		6.6 ± 3.8		
t 3 (n=8)		4.3 ± 2.3		
t 4 (n=17)		12.7 ± 13.0		5.6 ± 1.8
甲状腺外浸潤				
Ex (-) (n=34)	14.2 ± 11.1	5.6 ± 3.4	19.8 ± 10.3	
Ex (+) (n=17)	12.7 ± 13.0	5.6 ± 1.8	18.3 ± 13.3	NS
リンパ節転移				
n (-) (n=20)	16.8 ± 10.8	5.4 ± 3.1	22.2 ± 10.4	
n (+) (n=31)	11.5 ± 11.8	5.8 ± 2.8	17.4 ± 11.5	NS
遠隔転移				
M (-) (n=48)	13.9 ± 11.8	5.6 ± 3.0	19.5 ± 11.3	
M (+) (n=3)	8.3 ± 8.5	6.3 ± 1.5	14.7 ± 10.0	NS

平均値 ± 標準偏差 \* p < 0.01, \*\* p < 0.05

表13 予後と増殖期細胞の割合の関係

	%S	%G <sub>2</sub> M	%S+G <sub>2</sub> M
無再発生存群 (n=11)	7.5±7.1	5.5±3.3	13.0±7.1
再発生存群 (n=9)	13.8±11.5	5.7±1.7	19.4±11.3
早期死亡群 (n=6)	18.8±17.9	6.7±1.4	25.5±17.4

NS  
平均値±標準偏差

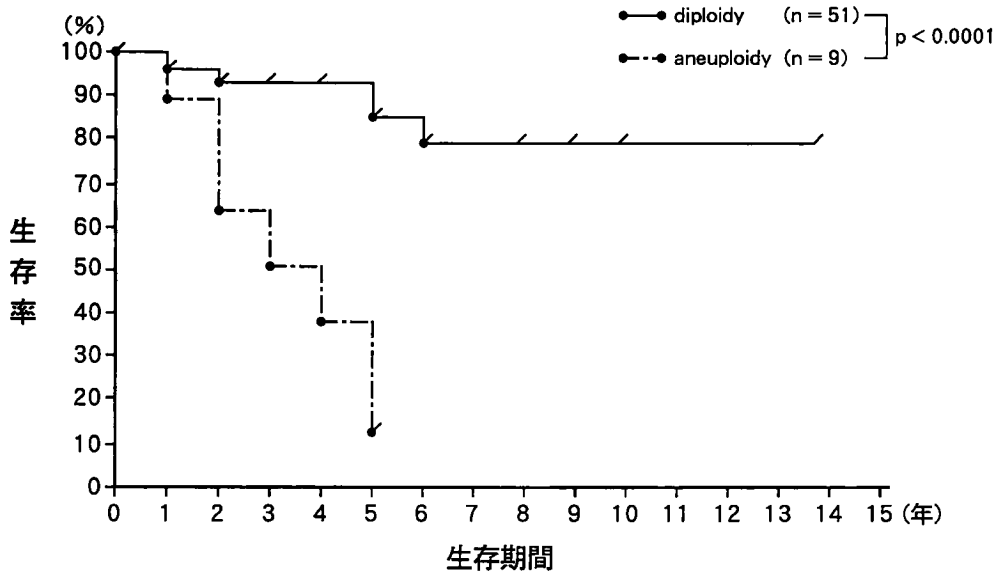


図2 Ploidy pattern 別累積生存率 (Kaplan-Meier 法)

さらに、予後により分けた3群で aneuploidy の出現率を比較すると、無再発生存群には aneuploidy を示した症例はなく、再発生存群で10% (1/10)、早期死亡群で53.8% (7/13) に aneuploidy の出現をみた。早期死亡群は無再発生存群、再発生存群と比べ有意に aneuploidy の出現率が高かった。

また、この3群に属する diploidy 症例の増殖期細胞の割合は、無再発生存群で %S 7.5±7.1, %G<sub>2</sub>M 5.5±3.3, %S+G<sub>2</sub>M 13.0±7.1, 再発生存群で %S 13.8±11.5, %G<sub>2</sub>M 5.7±1.7, %S+G<sub>2</sub>M 19.4±11.3, 早期死亡群で %S 18.8±17.9, %G<sub>2</sub>M 6.7±1.4, %S+G<sub>2</sub>M 25.5±17.4 であり、いずれも早期死亡群が最も高値を示し、以下再発生存群、無再発生存群の順であった。統計学的有意差は認められないものの、%S, %S+G<sub>2</sub>M ではこの傾向が顕著であった。

考 察

近年、FCM の急速な普及により固形癌の核 DNA 量の解析が多く試みられ、癌の生物学的悪性度の観点から注目されるようになった。とくに1983年 Hedley ら<sup>26)</sup> がパラフィン包埋ブロックを使用した FCM による核 DNA 量の測定方法を報告して以来、臨床経過の判明した症例の retrospective な検討が容易となり、各種悪性腫瘍の予後と核 DNA 量の関係についての研究が数多く報告<sup>1)-7)</sup> されてきた。一般に aneuploidy を示す腫瘍あるいは増殖期細胞の割合の高い腫瘍は予後が悪く腫瘍の生物学的悪性度の指標の一つとして有用であるという見解が多い。

甲状腺癌の核 DNA 量に関する研究<sup>10)-20)</sup> も散見されるが、生物学的悪性度との関連についての結果は必ずしも一定していない。

甲状腺分化癌の予後と ploidy pattern に関して、Joensuu ら<sup>11)</sup> は aneuploidy を示す症例は diploidy を示す症例より有意に生存率が悪いと報告し、山下ら<sup>17)</sup> は再発例、死亡例などの予後不良例で aneuploidy が高率に認められたと報告している。また予後と増殖期細胞の割合に関して、Cohn ら<sup>10)</sup> は甲状腺乳頭癌で 2.5C 以上の細胞の占める比率が、死亡例で 70% 以上であったが、10 年以上生存例では 60% 以下であり、予後の推測が可能であると述べ、吉田<sup>14)</sup> は甲状腺分化癌の再発例では、術後早期に再発を認めたものほど手術時の DNA histogram 上高倍体域の細胞が増加しており、3C 以上の細胞出現率と再発までの期間には負の相関が認められたと報告している。

今回の検討において、甲状腺分化癌の予後と ploidy pattern との間には一定の関連を認め、また増殖期細胞の割合との間にも統計学的有意差は認めないものの一定の傾向を認めた。

すなわち、甲状腺分化癌を対象とした検討において、aneuploidy 群は diploidy 群より明らかに生存率が低く、さらに予後により分けた 3 群間の検討でも、早期死亡群は無再発生存群、再発生存群のいずれと比べても有意に aneuploidy の出現率が高かった。またこの 3 群間で diploidy を示した症例の増殖期細胞の割合を比較すると %S, %G<sub>2</sub>M, %S+G<sub>2</sub>M はいずれも早期死亡群が最も高値を示し、以下再発生存群、無再発生存群の順であり、予後の悪いものほど増殖期細胞の割合が高い傾向を認めた。

従って、甲状腺分化癌においても、これまでの他臓器における報告<sup>17)20)</sup> と同様 aneuploidy を示すものは予後不良であり、甲状腺分化癌の生物学的悪性度と強い関連があると考えられた。また、増殖期細胞の割合に関しても、予後不良のものに増殖期細胞の割合が高い傾向を認め、増殖期細胞の割合と甲状腺分化癌の生物学的悪性度との関連性が示唆された。

一方、従来より甲状腺癌の予後因子<sup>27)–33)</sup> として検討されている年齢、性別、組織型、腫瘍の進行度などの臨床病理学的諸因子と核 DNA 量の関連を検討した結果、これらの因子のうち ploidy pattern あるいは増殖期細胞の割合との

間に一定の関連を認めたのは組織型と年齢のみであり、腫瘍の進行度は ploidy pattern、増殖期細胞の割合のいずれとも有意な関連を認めなかった。

年齢、性別などの背景因子と核 DNA 量に関するこれまでの報告で、Klemi ら<sup>12)</sup> は甲状腺未分化癌の検討で aneuploidy の出現頻度は、年齢が上昇するに従って高くなっていくと報告し、土屋ら<sup>16)</sup> は種々の甲状腺癌の核 DNA 量を測定し、ploidy pattern と年齢との間に一定の関連は認めなかったと報告している。また、元村<sup>15)</sup> は、FCM により甲状腺腫瘍内 DNA 量を測定し、甲状腺癌における年齢、性別と DNA index, %S+G<sub>2</sub>M (proliferative index, 以下 PI 値) との関連を検討し、年齢と DNA index, PI 値との間に特徴的な関連はみられず、性別との関連では DNA index, PI 値は男性例に高値を示す傾向を認めたとし、吉田<sup>14)</sup> は甲状腺癌の性、年齢と高倍体域の細胞の割合との間に一定の関連は認めなかったと報告しており、結果はさまざまである。

今回の著者の結果は、年齢に関しては ploidy pattern との間には一定の関連は認められなかったが、増殖期細胞の割合は高齢になるほど %S, %S+G<sub>2</sub>M が増加していた。高齢になるほど %S, %S+G<sub>2</sub>M が高値を示す理由は明らかでないが、高齢になるほど腫瘍がその生物学的悪性度を増す可能性が考えられた。また、性別に関しては ploidy pattern、増殖期細胞の割合のいずれとも一定の関連は認められなかった。

次に甲状腺腫瘍の組織型と核 DNA 量の関係に関して、核 DNA 量を良悪性間で比較したこれまでの報告で、土屋ら<sup>16)</sup> は癌と腺腫の比較で、腺腫はすべて diploidy であり、aneuploidy は癌のみ認められたと報告しているが、良性腫瘍や非腫瘍性病変に aneuploidy が出現したという報告<sup>11)14)18)</sup> もある。さらに癌の組織型別で検討した報告をみると、吉田<sup>14)</sup> は蛍光顕微測光法で核 DNA 量を測定し、未分化癌はほとんどが aneuploidy であり、分化癌より aneuploidy の出現率が高かったと報告し、土屋ら<sup>16)</sup> は未分化癌 4 例中 3 例が diploidy を示し、臨床所見との食い違いを示す結果であったと報告している。



また、増殖期細胞の割合に関しても、癌と腺腫の間で%S, %G<sub>2</sub>M に差は見られなかったという報告<sup>19)</sup>がある反面, %S に差はないが, %G<sub>2</sub>M は癌において2倍高かったという報告<sup>19)</sup>や癌腫の%S+G<sub>2</sub>M (PI値)は濾胞腺腫よりも有意に高いという報告<sup>14)15)</sup>もみられ, ploidy pattern 同様, 結果は一定していない。癌の組織型別の検討で吉田<sup>14)</sup>は, 未分化癌は高倍体域の細胞が分化癌より有意に高く, また分化癌である乳頭癌の比較では, 濾胞癌で増殖相または高倍体域の細胞が増加している傾向を認めたと報告し, 元村<sup>15)</sup>はPI値で比較し, PI値は髄様癌が最も高く, ついで濾胞癌, 乳頭癌の順に高値を示したと報告している。

今回の著者の結果では, 良悪性間の ploidy pattern の比較において良性腫瘍である濾胞腺腫に aneuploidy は認められず, aneuploidy を示した症例はすべて悪性(癌)であり, 土屋<sup>16)</sup>の結果と同様であった。さらに癌の組織型による比較では, きわめて悪性度が高いと考えられている未分化癌は全例 aneuploidy を示し, 乳頭癌, 濾胞癌, 髄様癌のいずれと比べても aneuploidy の出現率が高かった。

このことは aneuploidy を示す腫瘍は予後が悪く, 生物学的悪性度が高いのではないかという予後と ploidy pattern の関係から考えると当然の結果であり, 濾胞腺腫の良性腫瘍としての性格と未分化癌の臨床的悪性度を裏づける結果となった。

また, diploidy 症例における増殖期細胞の割合に関して, 良悪性間では%S, %G<sub>2</sub>M, %S+G<sub>2</sub>Mのいずれも癌症例に比べ濾胞腺腫が低値を示す傾向を認め, %G<sub>2</sub>Mでは有意差を認めた( $p < 0.01$ )。癌の組織型に関しては濾胞癌の%S, %S+G<sub>2</sub>Mが高い傾向を示し, 乳頭癌との間では有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

良悪性間での増殖期細胞の割合に関する著者の結果は, Mattfeldt らの報告<sup>19)</sup>と類似するものであり, 濾胞腺腫には%G<sub>2</sub>Mが5%を越えるものは認められず, 良悪性の鑑別の一つの指標になり得ると考えられた。さらに癌の組織型に関しては, これまでの報告と同様に, 乳頭癌と比べ濾胞癌の方が増殖期細胞の割合が高いとい

う結果であった。予後不良のものに増殖期細胞の割合が高い傾向を認めた予後との関係から推察すると, この結果は濾胞癌の方が乳頭癌より生物学的悪性度が高いことを示すのではないかと考えられ, 一般に濾胞癌は乳頭癌に比較してやや予後が悪いとされる濾胞癌の臨床的悪性度を裏づける結果であった。

甲状腺癌の進行度と核DNA量に関して, これまでの報告をみると, 元村<sup>15)</sup>は, 甲状腺癌において病理学的進行度(腫瘍体積, リンパ節転移率)とDNA index, PI値の間に関連は認められなかったとし, 吉田<sup>14)</sup>も甲状腺腺癌の腫瘍の長径, リンパ節転移の程度と高倍体域の細胞の割合との間に一定の関連は認めなかったと報告している。

今回の著者の結果も同様で, 組織学的腫瘍径(t), 甲状腺外浸潤の有無(Ex), リンパ節転移の有無(n), 遠隔転移の有無(M)はいずれも ploidy pattern, 増殖期細胞の割合との間に一定の関連は認められなかった。従って ploidy pattern, 増殖期細胞の割合は腫瘍の進行度とは別の観点から甲状腺分化癌の特性を表す指標となり得ると考えられた。

以上, 単変量解析のみによる検討ではあるが, 甲状腺分化癌の悪性度を判定するにあたっての ploidy pattern および増殖期細胞の割合の重要性が示された。特に, この内の増殖期細胞の割合は, 甲状腺分化癌における aneuploidy の出現率を考慮した場合, より有用であると考えられる。すなわち, 今回の検討において aneuploidy の出現率が15.0% (9/60)と低く, これまでの15~30%との報告<sup>11)16)19)20)</sup>と同様であったことは, 甲状腺分化癌の生物学的悪性度の低さを物語るとともに, その悪性度の判定は ploidy pattern のみはできないことを示しているからである。したがって, 今回の検討で甲状腺分化癌の増殖期細胞の割合が, ploidy pattern と同様に予後と関係しており, そして腫瘍の進行度とは異なった独立した指標であることが示唆されたことから, 甲状腺分化癌の悪性度を知る上で細胞周期を調べることは有用かつ不可欠であると思われた。

今後症例を増やして, 甲状腺分化癌の生物学

的悪性度の指標としての ploidy pattern あるいは増殖期細胞の割合の意義をより明確にするとともに、抗 bromodeoxyuridine (BrdU) 抗体、Ki-67などを利用した新鮮標本による prospective な検討も必要と思われた。

### 結 論

1. 甲状腺分化癌のうち aneuploidy を示すものは、生物学的悪性度が高いと考えられた。

2. diploidy を示す甲状腺分化癌のうち増殖期細胞の割合の高いものに、生物学的悪性度が高い傾向が認められた。

3. FCM による核 DNA 量の測定によって得られる ploidy pattern 及び増殖細胞の割合は、甲状腺分化癌の生物学的悪性度を知る上で有用な指標となる可能性が示唆された。

4. 特に甲状腺分化癌の8割以上を占めた diploidy 症例の生物学的悪性度の判定には、細胞周期の解析による増殖期細胞の割合を知ることが不可欠であると考えられた。

5. 今後の臨床応用に当たっては、増殖期細胞の割合をより正確に測定するために BrdU、Ki-67などを利用し、prospective な検討を行うことが必要である。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った寺本 滋教授に厚く御礼申し上げます。また、直接ご指導いただきました小松原正吉講師、臼杵尚志助手に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、平成4年9月第9回国際内分泌学会 (NICE) において発表した。

### 文 献

- 1) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreeff M and Freireich EJ: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* (1983) **43**, 3982-3997.
- 2) Barlogie B, Johnston DA, Smallwood L, Raber MN, Maddox AM, Latreille J, Swartzendruber DE and Drewinko B: Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* (1982) **6**, 17-28.
- 3) Goh HS, Jass JR, Atkin WS, Cuzic J and Northover JMA: Value of flow cytometric determination of ploidy as a guide to prognosis in operable rectal cancer: A multivariate analysis. *Int J Colorectal Dis* (1987) **2**, 17-21.
- 4) Kokal W, Scheibani K, Terz J and Harada JR: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA* (1986) **255**, 3123-3127.
- 5) Teodori L, Capurso L, Cordelli E, De Vita R, Koch M, Tarquini M, Pallone F and Mauro F: Cytometrically determined relative DNA content as an indicator of neoplasia in gastric lesions. *Cytometry* (1984) **5**, 63-70.
- 6) Ewers SB, Langstrom E, Baldetorp B and Killander D: Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* (1984) **5**, 408-419.
- 7) Abe R and Ueki H: Flow cytometric analysis for assessing the malignant potential of breast cancer. *J Surg Oncol* (1987) **36**, 259-262.
- 8) 高橋 学: 医学の各領域への応用; フローサイトメトリーハンドブック, 天神美夫, 高橋 学, 野村和弘編, サイエンスフォーラム, 東京 (1984) pp 241-271.
- 9) Heliö H, Karaharju E and Nordling S: Flow cytometric determination of DNA content in malignant and benign bone tumors. *Cytometry* (1985) **6**, 165-171.
- 10) Cohn K, Bäckdahl M, Forsslund G, Auer G, Lundell G, Löwhagen T, Tallroth E, Willems JS, Zetterberg A and Granberg PO: Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid

- carcinoma. *World J Surg* (1984) **8**, 474-480.
- 11) Joensuu H, Klemi P, Eerola E and Tuominen J : Influence of cellular DNA content on survival in differentiated thyroid cancer. *Cancer* (1986) **58**, 2462-2467,
  - 12) Klemi PJ, Joensuu H and Eerola E : DNA aneuploidy in anaplastic carcinoma of the thyroid gland. *Am J Clin Pathol* (1988) **89**, 154-159.
  - 13) Hamming JF, Schelfhout LJD, Cornelisse CJ, van de Velde CJH, Goslings BM, Hermans J and Fleuren GJ : Prognostic value of nuclear DNA content in papillary and follicular thyroid cancer. *World J Surg* (1988) **12**, 503-508.
  - 14) 吉田 明 : 甲状腺腺癌における核 DNA 量と悪性度についての研究. *日外会誌* (1984) 1261-1273.
  - 15) 元村祐三 : フローサイトメトリーによる甲状腺腫瘍内 DNA 含量の測定—腫瘍の悪性度判定の試み—. *日外会誌* (1988) **89**, 1066-1074.
  - 16) 土屋敦雄, 関川浩司, 君島伊造, 鈴木真一, 二瓶光博, 六角裕一, 阿部力哉 : フローサイトメトリーによる甲状腺癌細胞核 DNA 量の検討. *癌の臨床* (1989) **35**, 886-890.
  - 17) 山下共行, 平山 章, 小原孝男, 藤本吉秀, 児玉孝也, 監物正視, 奥田明子 : 甲状腺乳頭癌パラフィン包埋標本を用いたフローサイトメトリーによる DNA ヒストグラム解析. *癌の臨床* (1990) **36**, 569-573.
  - 18) Kraemer BB, Srigley JR, Batskakis JG, Silva EG and Goepfert H : DNA flow cytometric of thyroid neoplasms. *Arch Otolaryngol* (1985) **111**, 34-38.
  - 19) Mattfeldt T, Schürmann G and Feichter G : Stereology and flowcytometry of well-differentiated follicular neoplasms of the thyroid gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (1987) **410**, 433-441.
  - 20) Greenebaum E, Koss LG, Elequin F and Silver CE : The diagnostic value of flow cytometric DNA measurements in follicular tumors of the thyroid gland. *Cancer* (1985) **56**, 2011-2018.
  - 21) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT and Blijham GH : Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* (1985) **6**, 26-30.
  - 22) VindeløV LL, Christensen IJ and Nissen NI : A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* (1983) **3**, 323-327.
  - 23) Dean PN : Method of data analysis in flow cytometry ; in *Progress in Flow Cytometry*, Dilla MV, Dean PN, Laerum O and Melamed M eds, Academic, San Francisco (1985) pp 195-221.
  - 24) UICC. Union Internationale Contre le Cancer : TNM classification of malignant tumors, third edition. Geneva (1978)
  - 25) 甲状腺外科検討会編 : 外科・病理甲状腺癌取扱い規約, 第4版. 金原出版, 東京 (1991) pp 6-26.
  - 26) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA and Musgrove EA : Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* (1983) **31**, 1333-1335.
  - 27) Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Glise HA, Mayer M, Sylvester R and Glabbeke M : A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the EORTC Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer* (1979) **15**, 1033-1041.
  - 28) Kerr DJ, Burt AD, Boyle P, MacFarlane GJ, Storer AM and Brewin TB : Prognostic Factors in thyroid tumors. *Br J Cancer* (1986) **54**, 475-482.
  - 29) Bacourt F, Asselain B, Savoie JC, Hubert ED, Massin JP, Doucet G, Leger A and Garnier H : Multifactorial study of prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma and a re-evaluation of the importance of age. *Br J Surg* (1986) **73**, 274-277.
  - 30) Schelfhout LJD, Creutzberg CL, Hamming JF, Fleuren G, Smeenk D, Hermans J, van de Velde

- CJH and Goslings BM : Multivariate analysis of survival in differentiated thyroid cancer : the prognostic significance of the age factor. *Eur J Cancer & Clin Oncol* (1988) **24**, 331-337.
- 31) Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Caillou B, Travagli JP and Parmentier C : Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* (1985) **55**, 794-805.
- 32) Tennvall J, Biorklund A, Möller T, Ranstam J and Åkerman M : Is the EORTC prognostic index of thyroid cancer valid in differentiated thyroid carcinoma ? *Cancer* (1986) **57**, 1405-1414.
- 33) Hannequin P, Liehn JC and Delisle MJ : Multifactorial analysis of survival in thyroid cancer. *Cancer* (1986) **58**, 1749-1755.

## Flow cytometric DNA analysis in thyroid tumors

Yuji ONODA

Second Department of Surgery,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan  
(Director : Prof. S. Teramoto)

To evaluate the biological malignancy of differentiated thyroid cancer, we determined the nuclear DNA content in thyroid tumors by flow cytometry using paraffin-embedded materials. The subjects were 80 patients with thyroid tumors. The thyroid tumors were follicular adenoma in 11 cases and thyroid cancer in 69 cases. Of the 69 cases of thyroid cancer, 42 were histologically classified as papillary carcinoma, 18 as follicular carcinoma, 3 as medullary carcinoma and 6 as anaplastic carcinoma. DNA ploidy pattern and the percentage of proliferating phase cells were analyzed in relation to the prognosis and the following clinicopathological findings : age, gender, histological type, tumor size (t), extrathyroidal invasion (Ex), lymph node metastases (n) and distant metastases (M). DNA ploidy pattern correlated with histological type ( $p < 0.005$ ), but did not correlate with other clinicopathological findings. The percentage of proliferating phase cells correlated with age ( $p < 0.01$ ) and the histological type ( $p < 0.05$ ), but did not correlate with other clinicopathological findings. The percentage of proliferating phase cells correlated with age ( $p < 0.01$ ) and the histological type ( $p < 0.05$ ), but did not correlate with other clinicopathological findings. The cumulative survival rate (Kaplan- Meier) of differentiated carcinomas was worse in the aneuploid group than in the diploid group ( $p < 0.0001$ ). The percentage of proliferating phase cells increased as the prognosis deteriorated. The results suggest that flow cytometric DNA analysis may be useful to evaluate biological malignancy of thyroid tumors.