

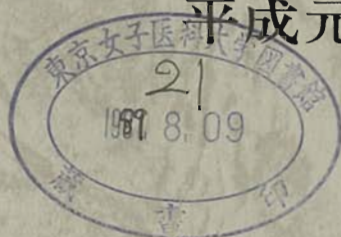
24

原発性上皮小体機能亢進症 の病理組織型診断における Flowcytometryの応用

(課題番号 62570581)

昭和63年度科学研究費補助金
(一般研究C)研究成果報告書

平成元年 3月



研究代表者 小原孝男

(東京女子医科大学・医学部・助教授)

は し が き

原発性上皮小体（副甲状腺）機能亢進症を起こす上皮小体病変には、腺腫、癌、過形成の3つがある。それぞれの病理組織型を診断する場合に、通常の病理組織検査法では判定がはっきりとできないことがしばしばあり、とくに上皮小体癌の診断は難しいことで定評がある。我国では、原発性上皮小体機能亢進症患者全体の中で上皮小体癌によると考える症例の割合が5-6%あり、欧米でのその頻度、1%以下に比べて高いので、その診断法の開発ならびに診断基準の確定は重要な課題である。また、上皮小体の病態は、いくつかの異なった形に分れる可能性があるから、そうした病態の違いを判定するに役立つ指標を得る研究もぜひ必要である。

最近、各種の固形癌に対して、flow-cytometryによるDNAヒストグラム解析の研究が進み、いくつかの腫瘍では、この方法によるDNAパターン解析が癌の診断確定ならびに予後の指標として有用であるという。本研究では、上皮小体病変について、Flow-cytometryが上皮小体癌の病理診断法として役立つか、上皮小体癌の病態を分ける何らかの指標になりうるか、を検討することが主な目的であった。

本研究では、原発性上皮小体機能亢進症の上皮小体病変におけるflow-cytometryの応用に関して、研究成果の項で示すように、いくつかの新知見を得ることができた。まだ、解析の充分でない点があり、諸兄のご批判とご教示をお願いしたい。終わりに文部省科学研究費によるご援助に対して深く感謝の意を表する。

研究組織

研究代表者：小原孝男（東京女子医科大学・医学部・内分泌外科・助教授）

研究経費

昭和62年度	900千円
昭和63年度	500千円
計	1400千円

研究発表

(1)学会誌等

- (Y. Fujimoto and Takao Obara: How to recognize and treat parathyroid carcinoma. Surg. Clin. North. Am., 67巻2号、昭和62年4月)
- (小原孝男、藤本吉秀：原発性副甲状腺機能亢進症の治療。治療 69巻11号、昭和62年11月)
- (小原孝男：原発性副甲状腺機能亢進症外科治療の現状と問題点。ホルモンと臨床 35巻9号、昭和62年9月)
- (小原孝男：副甲状腺機能亢進症—外科から。臨床医 14巻3号、昭和63年3月)
- (小原孝男：原発性上皮小体機能亢進症の病裡組織型診断に関する研究。Scope、27巻4号、昭和63年4月)
- (小原孝男、藤本吉秀：副甲状腺癌 a. 病期・病型分類と治療法の選択。日本臨床、46巻増刊号、昭和63年10月)
- (小原孝男、藤本吉秀：副甲状腺癌 b. 外科治療。日本臨床、46巻増刊号、昭和63年10月)
- (小原孝男、藤本吉秀：副甲状腺癌 c. 化学療法。日本臨床、46巻増刊号、昭和63年10月)
- (小原孝男、藤本吉秀：副甲状腺癌 d. 集学的療法。日本臨床、46巻増刊号、昭和63年10月)
- (小原孝男：第15回内分泌外科クリニカルカンファランス、上皮小体癌—診断と治療をめぐる(発言)。内分泌外科、5巻4号、昭和63年11月)

(2)口頭発表

- (小原孝男、他：パラフィン包埋標本からえた上皮小体細胞のFlow cytometryによるDNAパターンの解析。日本癌学会、昭和63年9月)
- (Takao Obara, et al.: Flow cytometric DNA analysis of parathyroid tumors: Implication for aneuploidy for pathological and biological classification. 33rd World Congress of Surgery, 平成元年9月、発表予定)

研究成果

原発性上皮小体機能亢進症を起した上皮小体病変について行なった、Flow cytometryによるDNAヒストグラム解析は、(1)パラフィン包埋標本を用いたretrospectiveな研究、(2)新鮮標本を用いたprospectiveな研究、の2つからなる。

I パラフィン包埋標本を用いたretrospectiveな研究

1. 研究対象、材料は、原発性上皮小体機能亢進症49例から摘除した上皮小体腫瘍性病変のパラフィン包埋標本である。その内訳は表1に示した。

表1. 上皮小体病変の内訳

病理組織型	症 例 数	DNA解析病変数
癌	15例 原発巣のみ 8例	原発巣 13
	原発巣+再発巣 5例	局所再発巣 4
	再発転移巣のみ 2例	転移リンパ節 2
		肺転移巣 5
腺腫	29例	29
過形成	5例	15
合計	49例	68

2. 上記の上皮小体病変の病理組織診断は次の基準によった。

(1)癌：Schantz and Castlemanの診断基準をほぼ満足する腫瘍

(腫瘍細胞の核分裂像と索状配列の所見はあるが、厚い被膜や結合織梁の形成と被膜または血管侵襲像の所見を認めない腫瘍は含まない)。

①初回手術後、局所再発、リンパ節転移、肺転移を生じた症例 8例

②経過観察期間中再発の徴候はない症例 7例

(2)腺腫：単発性の腫瘍で癌の診断基準を満足しない腫瘍。

(3)過形成：多内分泌腺腫瘍症第I型患者の多発性腫瘍。

3. FlowcytometryによるDNA-histogram解析の方法

- (1) Paraffin blockから30 μ mの切片を3-4枚作り、slide glassにのせ60-70°Cに加熱しparaffinを溶解する。さらにxyleneにつけてparaffinを除去する。
 - (2) 常温で10分間、100%, 90%, 70%, 50%のethanolに順次つけてrehydration。
 - (3) slide glassから組織を剥離し、0.5% pepsin生理食塩水(pH 1.5)につけ、眼科用剪刀で細切する。さらに30°Cで30分間incubate(10分ごとにvortexで攪拌)。
 - (4) meshを通してsingle cellとしたのち、hemocytometerにて算定し、 1×10^6 個の細胞を得る。
 - (5) CRBC, TRBCをinternal standardとして加え、propidium iodideで染色。
 - (6) Cytofluorograf System 50Hで測定し、PC-8801 mK IIにて解析。
4. 症例の術後経過観察期間は平均4.4年であり、この間の高カルシウム血症の持続・再発の有無、ならびに上皮小体癌症例については、局所再発、リンパ節転移、血行性転移など、悪性腫瘍としての病態を調べ、flow cytometryによるDNA-histogram解析の結果と対比検討した。

5. 結果

(1) DNA解析とploidy

最初の明らかな G_0/G_1 peak以外にabnormalな G_0/G_1 peakをみとめ、そこに最尤値がある場合をaneuploidとした。典型的なaneuploidのpatternをdiploidのpatternと対比して図1に示した。

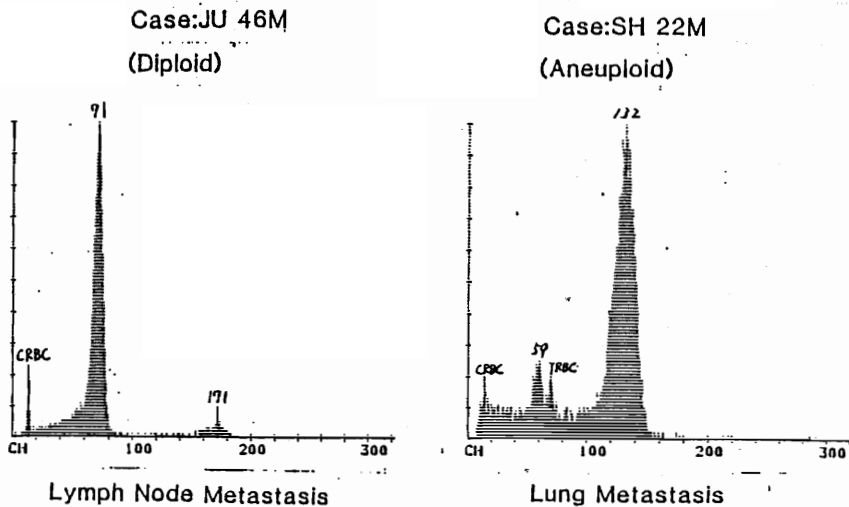


図1. diploid・aneuploidのDNA histogram

(2)ploidyのgenetic stability

再発上皮小体癌についての検索では、原発巣、局所再発巣、転移巣などでploidyの変わる症例はなかった。そのことを表わす上皮小体癌の1例の原発巣、転移巣のDNA histogramを図2に示した。

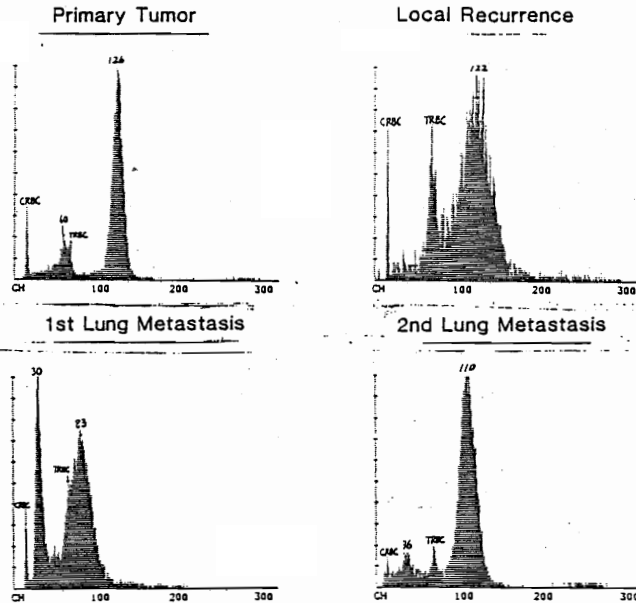


図2. 上皮小体癌のDNA histogramのstability

(3)aneuploid腫瘍について上皮小体病理組織型との関連を検討したところ次のような結果をえた(表2)。

- ①DNA-histogramを検索した、上皮小体腫瘍性病変68のうち7病変(10%)がDNA-aneuploidであった。
- ②病理組織型別にaneuploid腫瘍の出現頻度をみると、癌の27%、腺腫の10%がaneuploidであり、過形成ではaneuploid腫瘍を認めなかった。
- ③癌と腺腫の病理組織型別では、aneuploidの頻度に有意差はない。
- ④aneuploid腫瘍のDNA index (DI)は癌では1.56-3.06(平均2.34)、腺腫では1.48-1.85(平均1.67)であった。

表2. 病理組織型別のaneuploidの頻度

病理組織型	癌	腺腫	過形成
症 例 数	15	29	15
aneuploid腫瘍数	4	3	0
(%)	(27%)	(10%)	(0%)

(4)上皮小体癌症例についてDNA-ploidyと臨床経過との関連を検討し、次の結果をえた(表3)。

(1)aneuploidの癌

- ① 4例すべてが再発。
- ② 3例は、長くても3年の間隔で局所再発、肺転移などの再発を繰り返し起こしている。初回手術後12年で、癌死した1例がある。
- ③ 1例のみは、局所再発摘除後9年を経過し、健常である。

(2)diploidの癌

- ① 4例で再発を認めるが、7例では初回手術後2-5年間再発の徴候はない。
- ② 2例はリンパ節転移、1例は肺転移による再発を生じた。1例は再手術を施行したが再発部位の確認はできなかった。
- ③ リンパ節転移再発の2例は、再手術後3、6年を経過するが健常である。肺転移摘除後7年を経た1例は、血清Ca軽度高値(11 mg/dl)ながら健康な日常生活を送っており、高カルシウム血症の症状はほとんどない。

表3. 上皮小体癌のDNA-ploidyと臨床経過

DNA	症例数	再発例	局所再発	リンパ節転移	肺転移*	癌死
Aneuploid	4	4(100%)	3	2	3	1
Diploid	11	4(36%)	2	1	1	0

* p < 0.05

(5)上皮小体腺腫と過形成のDNA-ploidyと臨床経過

- ① aneuploidの腺腫3例は、初回手術後それぞれ1,3,5年経過するが、再発の徴候はない。
- ② diploidの腺腫26例では、初回手術後1-7年(平均3.6年)経過するが、再発の徴候はない。
- ③ 過形成でも再発した症例はない。術後経過期間2-9年(平均5年)である。

(6)病理組織所見とDNA-ploidy

- ① 病理組織所見から上皮小体癌をaneuploidの腫瘍とdiploidの腫瘍とに鑑別することは難しい。

- ②aneuploidの上皮小体腺腫3例中2例では、腫瘍細胞の索状配列と核分裂像を認めた。ただし、厚い被膜と結合織梁の形成の所見はない。また1例では、結合織梁の形成所見はあるが、腫瘍細胞の核分裂像や索状配列の所見を認めない。
- ③diploidの上皮小体腺腫26例の中にも、結合織の増生、腫瘍細胞の索状配列や核分裂像などの所見を認める腫瘍が3例ある。

6. 考察

- (1)DNA-histogramを、ここでは、aneuploidとdiploidに大別した。tetraploid、hypodiploid、peridiploidなどに分ける考えがあるが、細かい分類は行っていない。paraffin blockを用いたFlow cytometryでは、fresh materialの場合と異なり、測定標本作成過程で細胞の単一化が完全とはかぎらない、cell debrisが混入しうる、また、個々の細胞でDNA染色の程度にかなりの違いがある、などのいろいろな問題点があるからである。
- (2)ただ、diploidとした腫瘍の中には、hypodiploidの場合やdiploid stem lineのほかにtetraploidのstemlineを有する場合を含む可能性がある。
- (3)aneuploidの頻度が上皮小体癌で27%あることは問題ないとしても、腺腫でも10%ある。従ってaneuploid腫瘍であることは、上皮小体癌を確定診断するための根拠には必ずしもならない。aneuploidの上皮小体腺腫があることは、Bowlbyら(Am J Pathol 1987, 128:338)も報告している。また、甲状腺濾胞腺腫、乳腺良性腫瘍でも少数ながらaneuploidの場合がある。
- (4)ただし、aneuploidの腺腫では、腫瘍細胞の核分裂像など増殖性の強さを表す病理組織所見を認めるので、悪性の性状を有する可能性がなお残る。ただ、臨床的には、腫瘍摘除で治癒したと考えることができる。
- (6)病理組織学的に癌の診断がつく腫瘍の場合に限ると、DNA-histogram解析は、腫瘍の悪性度や予後を判定する指標として役に立つ可能性がある。ここに示したように、aneuploidの癌では、再発や肺転移出現の頻度が高い傾向があり、また癌死した1例ではaneuploid腫瘍であったからである(統計学的には、肺転移に関してだけ有意差がある)。

7. 結論

パラフィンブロックを用いたFlow cytometryによるDNA解析は、上皮小体癌の診断を確定することは必ずしもできないが、予後の指標として役立つ可能性が高い。

II 新鮮標本を用いたprospectiveな研究

1. 研究材料は、東京女子医科大学内分泌センター外科で、昭和62年5月から平成元年2月までの1年9月間に手術した63例の原発性上皮小体機能亢進症患者からえた上皮小体病変の新鮮標本である。

その内訳として、上皮小体癌転移巣が3病変（肺転移1、リンパ節転移2）ある。残りの60の上皮小体原発病変は、病理組織学的に、癌5、腺腫51、過形成4に分れた。病理組織診断基準はIの2項に記したとおりである。

2. Flow cytometryのための上皮小体細胞標本の作成およびDNA histogram解析の方法

(1) 標本細胞の作成方法

① 上皮小体腫瘍摘除後、直ちに標本の一部を無菌的に細胞培養液の中に移し、脂肪細胞や腫瘍被膜を除去した後、上皮小体腫瘍組織をを剪刀で細切する。

② PBSと0.2%BSAで溶いたヒアロニダーゼとコアゲナーゼを細切した上皮小体組織に加え、スターラーを用いて37°Cで30分間incubateする。

③ その後DNAaseを0.1-0.3mg加えて、37°Cで15分間incubateし、遊離細胞とする。

④ 細胞をPBSで洗浄し、上清を除去した後、Vindelov bufferに細胞を浮遊させる。その細胞数は、 4×10^6 個とする。

(2) Flow cytometryによるDNA histogramの解析方法。

① 細胞の染色方法、Flow-cytometryなどは、Iと同じである。

② diploidのコントロールとしてCRBCとTRBCを入れたhisrogramと、さらに健常人の末梢血中の単核細胞を加えた標本のhistogramとを解析し上皮小体腫瘍細胞の G_0/G_1 のpeakが実際にdiploidであることを確かめた。

3 結果および考察

- (1) 解析可能で、しかもG₀/G₁のpeakの分散度が低いhistogramを61/62(97%)の標本で得ることができた(coefficient variation(CV)は、すべて7%以下で、平均4.2%)。
- (2) 明らかなaneuploid patternを12例で認めた。病理組織型別の内訳は、癌転移巣が3/3(100%)、病理組織学的癌3/5(60%)、腺腫4/49(8%)、過形成2/4(50%)であった(表4)。ただ、過形成の場合には、diploidの細胞が大部分を占め、それに加えて、小さいが明らかなaneuploid peakを認める型であった(図3)。

表4. 新鮮標本でのDNA解析—病理組織型別のaneuploidの出現率

病理組織型	癌(転移巣)	癌(組織検査上)	腺腫	過形成
症例数	3	5	49	4
aneuploidの (%)	3 (100%)	3 (60%)	4 (8%)	2 (50%)

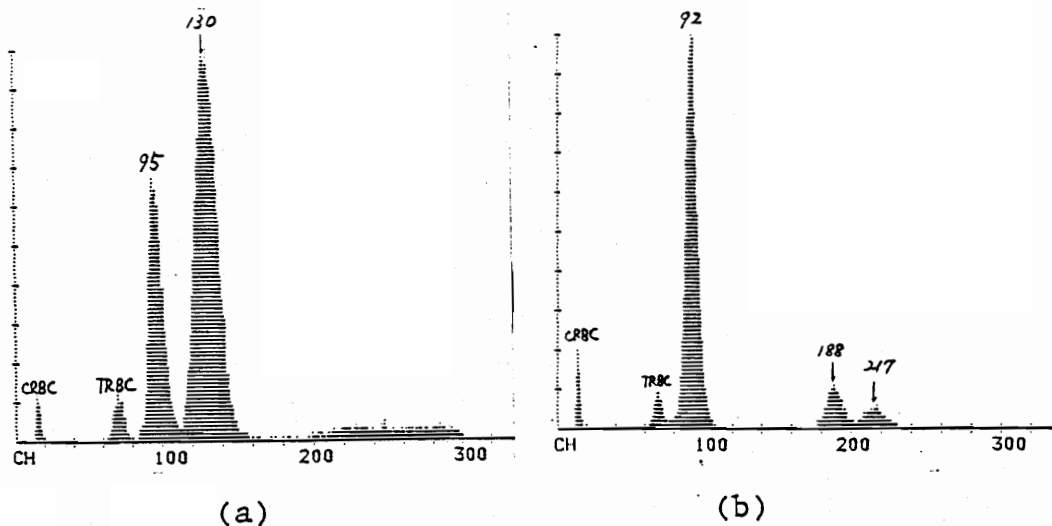


図3. 新鮮標本のDNA histogramで認めたaneuploid pattern
a. 癌 b. 過形成(MEN第I型)

- (3) 腺腫と転移癌、病理組織学的癌との間には、aneuploid patternの出現率について統計的な有意差がある(それぞれ $P < 0.001$ 、 $P = 0.02$)。従って、aneuploidの上皮小体腫瘍は癌である可能性が高いことがわかった。
- (4) 過形成すなわちMEN第I型でも、aneuploid patternを高頻度に認めたが、腺腫との間にはその出現率に統計的な有意差を認めなかった。過形成で小さなaneuploid patternが出現したのは、過形成をおこしている細胞クローンのheterogeneityを示すのかもしれない。

4 結論

新鮮標本のflow cytometryによるDNA解析は、上皮小体癌の診断の補助検査として役に立つ。