

# デスモイド型および Dupuytren 型線維腫症の 核 DNA 量解析による増殖能の比較

平川栄一郎<sup>1)\*</sup>, 山本康子<sup>1)</sup>, 佐々木真紀子<sup>2)</sup>,  
三木 洋<sup>2)</sup>, 中野正行<sup>3)</sup>, 白川敦子<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 香川県立医療短期大学臨床検査学科, <sup>2)</sup> 香川医科大学第一病理学  
<sup>3)</sup> 香川県予防医学協会病理部, <sup>4)</sup> 住友別子病院病理

## A Comparative Study of Proliferative Activity of Fibromatoses Using DNA Flow Cytometry

Eiichiro Hirakawa<sup>1)\*</sup>, Yasuko Yamamoto<sup>1)</sup>, Makiko Sasaki<sup>2)</sup>, Hiroshi Miki<sup>2)</sup>,  
Masayuki Nakano<sup>3)</sup> and Atsuko Shirakawa<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> *Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences*

<sup>2)</sup> *Department of Pathology, Kagawa Medical University*

<sup>3)</sup> *Pathology Section, Kagawa Association of Health Service*

<sup>4)</sup> *Clinical Laboratory, Sumitomo Besshi Hospital*

### Abstract

Fibromatosis of the soft tissue is a rare tumor or tumor-like lesion. However, occasional cases have recurrence and invasive pattern to surrounding tissue. For the objective evaluation of proliferative activity, twelve cases of histopathologically diagnosed fibromatoses including desmoid type and Dupuytren type were studied by flow cytometric DNA content analyses. The proliferative index (S+G<sub>2</sub>+M fraction) in invasive pattern was significantly higher than that in non-invasive pattern of fibromatoses. Aneuploidy was detected in two cases (16.7%) of fibromatoses. The frequency of DNA aneuploidy was not significant in either invasive pattern or non-invasive pattern of fibromatoses. These results suggest that the proliferative index is likely to be implicated in the invasive patterns and recurrence.

**Key Words** : desmoid fibromatosis (デスモイド線維腫症), Dupuytren fibromatosis (Dupuytren 線維腫症), flow cytometry (フローサイトメトリー)

\*連絡先 : 〒761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原281-1 香川県立医療短期大学臨床検査学科

\*Corresponding address : Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0123, Japan

## はじめに

デスマイド型線維腫症および Dupuytren 型線維腫症はいずれも良性の線維芽細胞の増殖疾患であるが、その浸潤性や局所再発をおこすことより治療が困難となり、臨床的に問題となる場合がある。侵襲性が明らかなものは侵襲性線維腫症というが、このようなものを生検材料で組織学的に区別することは困難であり<sup>1,2)</sup>、その侵襲性や再発を予測することは難しい。そこで、今回我々はデスマイド型線維腫症と Dupuytren 型線維腫症の手術材料のパラフィン包埋ブロックより核 DNA 量を解析し、その浸潤性や再発の有無との関係について検討した。

## 材料および方法

### 1. 対象

1989年1月より1996年12月までに香川医科大学第一病理学およびその関連施設で病理診断された線維腫症のうち、パラフィン包埋材料よりフローサイトメトリーによる DNA 量解析が可能であったデスマイド腫瘍9例と Dupuytren 型線維腫症3例を用いた。

### 2. DNA flow cytometry

細胞核 DNA 量の分析は、すべて10%緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用い Hedley<sup>3)</sup>および Vindeløv ら<sup>4)</sup>の方法を改変して細胞の分散を行った。HE 標本でデスマイド線維腫症と正常組織が含まれていることを確認した後、パラフィン包埋ブロックより40 $\mu$ m厚さの切片を4~5枚作り、キシレンにて脱パラフィン後、エタノールにて再水和を行い、細切後、0.5%ペプシン (0.9%NaCl, pH1.5) で37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションを行った。その後、50 $\mu$ mのナイロンメッシュを通して単離裸核遊離細胞を得た。裸核細胞は DNA 測定用試薬キット Cycle TEST (Becton Dickinson), A液 (trypsin, spermine を含む界面活性剤緩衝液), B液 (trypsin inhibitor, RNase を含む界面活性剤緩衝液), C液 (propidium iodide, spermine を含む界面活性剤緩衝液) を室温で加え、propidium iodide で染色した核浮遊液を作製した。測定および解析は FACScan/CellFIT DNA system (Becton Dickinson) を用いた。DNA ploidy の判定は、単一の  $G_0/G_1$  peak を有するものを DNA diploidy, 2つ以上の明瞭な  $G_0/G_1$  peak を有するものを DNA aneuploidy とした。細胞周期の分析には proliferating in-

dex ( $S+G_2+M$  期細胞比率) を用いた。CV 値が10%以上のもの、あるいは  $G_0/G_1$  peak が非対称のもの、shoulder を有するものは除外した。なお、有意差検定には Stat view4.5による t 検定を用いた。

## 結 果

デスマイド線維腫症の9例の組織学的分類は、腹壁デスマイド2例、腹壁外デスマイド5例、腹腔内デスマイド2例であり、腹腔内デスマイド2例のうち1例は Gardner 症候群に伴うものであった。Dupuytren 線維腫症の3例は、手掌線維腫症、足底線維腫症、陰茎線維腫症が各1例であった。それぞれの臨床病理学的な特徴とフローサイトメトリーによる分析結果を Table 1 にまとめた。12例いずれも組織学的には、核異型に乏しく、核分裂像も認められない線維芽細胞の増殖からなっていた。12例中6例 (腹壁外デスマイド3例、腹腔内デスマイド2例、足底線維腫症1例) は、肉眼的あるいは組織学的に周囲の脂肪織、結合織あるいは横紋筋組織、平滑筋組織などへの浸潤が認められた。症例7は症例6の6ヶ月後の再発であったが、両者には病理組織学的な相違は認めなかった。

フローサイトメトリーによる解析では線維腫症12例中10例 (83.3%) は DNA ploidy pattern が diploid に認められ、その DNA histogram の代表例 (症例1) を Figure. 1-A に示した。DNA index が1.1を越えた DNA aneuploidy pattern は症例4と症例10の2例 (16.7%) にみられた (Fig. 1-B, C)。病理組織学的に浸潤性増殖がみられた6例中、aneuploidy を認めたものは1例 (16.7%) のみであった。細胞周期の分析では浸潤性増殖を認めた線維腫症6例は高い proliferative index を示した (Fig. 2)。その平均値 (平均値 $\pm$ 標準偏差) は  $6.97 \pm 3.69$  で、浸潤を認めなかった残り6例の平均値  $3.53 \pm 1.46$  に比べて有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。

## 考 察

線維腫症という名称は良性の転移をおこさない線維性増殖疾患に対して用いられ、成人に発生する線維腫症はデスマイド型と Dupuytren 型に分けられる。デスマイド型線維腫症は、デスマイド腫瘍とも呼ばれ腱膜や筋肉内、軟部組織に発生する分化した線維芽細胞の増殖を示す線維腫症である。臨床病理

Table 1. Acorrelation of clinicopathological features and results of analysis by flow cytometry in fibromatoses

Case	Histological Type	Age/Sex	Location	Size(cm)	DNA ploidy (DI)	Proliferative index (%)	CV
1	AD	70/M	abdomen	1 × 1	diploid	5.5	2.9
2	AD	49/M	abdomen	12 × 8	diploid	3.8	2.2
3	ED	69/F	lt.neck	3 × 3	diploid	2.3	5.2
4	ED	63/F	lt.buttock	3 × 3	aneuploid (1.51)	4.1	5.1
5*	ED	66/F	lt.thigh	1 × 1	diploid	8.8	4.8
6*	ED	54/F	rt.shoulder	10 × 4	diploid	2.8	8.0
7**	ED	54/F	rt.shoulder	5 × 10	diploid	12.8	7.3
8*	ID in Gardner syndrome	42/F	mesenterium	inoperation	diploid	5.7	7.4
9*	ID	73/F	mesenterium	8 × 8	diploid	3.7	6.0
10*	DF	54/M	rt.plantar	2 × 2	aneuploid (1.26)	8.0	7.1
11	DF	42/M	both palmer	2 × 10	diploid	4.1	8.9
12	DF	51/M	dorsal of penis	0.5 × 1	diploid	1.4	7.3

AD : abdominal desmoid, ED : extraabdominal desmoid, ID : Intraabdominal desmoid,  
DF : Dupuytren fibromatosis, DI : DNA index, CV : coefficient of variation,

\*Invasive pattern, \*\*Invasive pattern and recurrent tumor

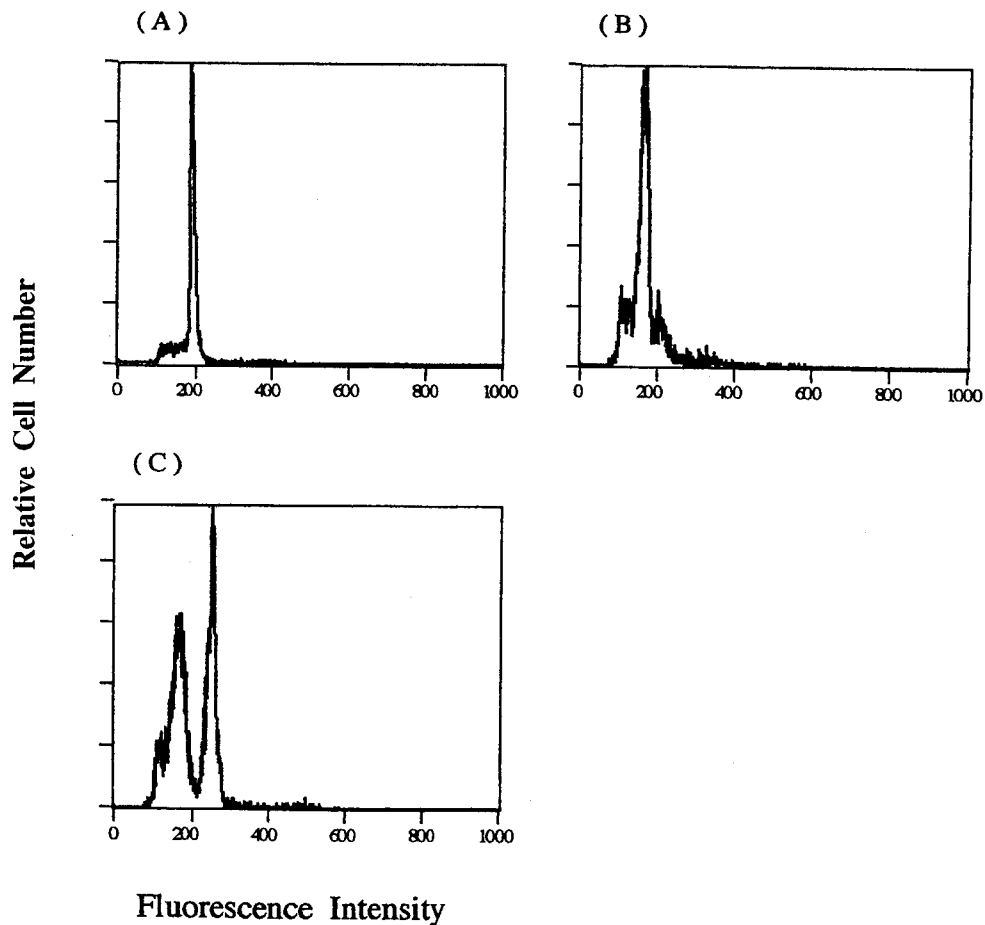


Fig. 1 Distribution of proliferative indexes.

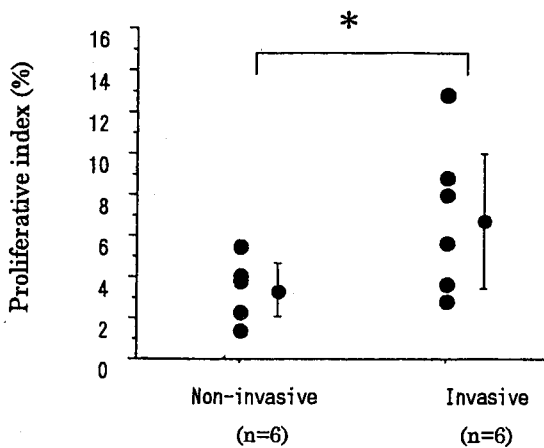


Fig. 2 Nuclear DNA histogram.  
\*  $p < 0.05$

学的に腹壁デスマイド、腹壁外デスマイド、腹腔内デスマイドの3型に分けられる。その原因は未だ不明であるが、エストロゲンの影響や年齢、外傷、手術歴の有無などの関与が指摘されている。良性腫瘍とされているが、外科的切除後にしばしば再発を繰り返し浸潤性の増殖をするため、その場合腫瘍の周囲をふくめて広範に切除しなければならない。一方、Dupuytren型線維腫症と総称される病変は手掌、足底、指背および陰茎に生じる線維腫症であり、早期には幼若な線維芽細胞が増殖する疾患であり、組織学的にはデスマイド線維腫症とほぼ同様の像をとる。Dupuytren型線維腫症の原因としては遺伝的因子の存在が考えられている<sup>1)</sup>。

一方、固形腫瘍を用いた核DNA量解析は、1983年にHedleyおよびVindeløvらがホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて報告<sup>3,4)</sup>して以来、この方法を応用しての報告がなされている<sup>5-8)</sup>。しかし、線維腫症については線維肉腫との比較において1報告をみるのみである<sup>9)</sup>。DNA ploidy patternの分析では一般に良性腫瘍ではdiploid patternを示し、悪性腫瘍ではaneuploidを示すものが多い。また、悪性腫瘍でもDNA量のモードがdiploidに近いものでは予後がよいという報告<sup>10)</sup>やdiploidに近い腺癌は高分化で、発育が遅く、転移が少ないものが多いという報告がなされている<sup>11)</sup>。

今回検討した12例のploidy patternの分析では10例(83.3%)がdiploidを示した。線維腫症は良性腫瘍であるのでこれは予想どおりの結果であり、Oshiroら<sup>9)</sup>による腹壁デスマイド11例と腹壁外デスマイド9例のDNA ploidy pattern検索結果ともほぼ一致する。しかし、今回検討したうちの2例は

aneuploidを示し、特に症例4の腹壁外デスマイドではDNA indexが1.51で、malignant potentialを推定させる1.4以上を示した。浸潤を示した6例で検討すると1例(16.7%)がaneuploidであり、浸潤を認めなかった6例でも1例(16.7%)にaneuploidが認められたので、浸潤性とploidy patternの間には有意差は認めなかった。また、aneuploidを示した2例は再発腫瘍ではなく、大きさも3cmあるいは2cm大であった。従ってDNA ploidy patternの結果は線維腫症の大きさや浸潤性、再発とは相関がないと考えられた。

細胞周期におけるproliferating indexの分析では、浸潤性増殖を示したものが浸潤を示さなかったものに比して有意に高かった。細胞の増殖能力の検討には一般にPCNAやKi-67の免疫組織化学染色が用いられるが、prospectiveな方法としてフローサイトメトリーによるS+G<sub>2</sub>+M期の解析が有用である<sup>12)</sup>。Oshiroらによれば浸潤性増殖を示す線維肉腫のproliferating indexは腹壁デスマイドと腹壁外デスマイドに比べて有意に高いことが報告されている。今回の結果は、同じ良性の線維腫症のなかでも浸潤性増殖を示す線維腫症の方が高い増殖能力を持っていることをあらわしている。浸潤性増殖が認められたのは腹壁外デスマイド5例中3例、腹腔内デスマイド2例中2例、Dupuytren線維腫症3例のうち足底線維腫症の1例で、計7例であった。腹壁外デスマイド、腹腔内デスマイド、足底線維腫症は線維腫症の他の組織型に比して摘除後の再発が多いとされている<sup>2)</sup>。従って今回の解析結果をふまえると本腫瘍の再発は、染色体の量的異常によるというよりは増殖能の高い浸潤部位の局所残存から生じる可能性が高いと考えられる。生検材料では線維腫症の病理診断はできても、異型や核分裂像に乏しいためその増殖能や浸潤性を判定することは困難である。しかし、今回のようにフローサイトメトリーを用いた核DNA量解析を行えばproliferating indexから、その増殖能の高さを判定できると考えられ、その後の切除範囲の決定や再発の予測に有用であると考えられた。しかしながら、今回の症例6,7では初発と再発でproliferating indexにかなりのひらきがみられた。その原因としては、一つの腫瘍のなかでも部位によりその増殖能力に違いがある可能性がある。たとえ摘除された部分の増殖能が低くても、浸潤部に残存した腫瘍の増殖能が強くと再発をきたした可能性が考えられるため、今後さらに多くの症例を追加した検討が望まれる。

## 文 献

- 1) 石川栄世, 遠城寺宗知編 (1989) “軟部腫瘍アトラス”, 文光堂, 東京, p64-71.
- 2) 石川栄世, 遠城寺宗知編 (1999) “外科病理学”, 文光堂, 東京, p1200-120
- 3) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al (1983) Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem*, 31 : 1333-1335.
- 4) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI (1983) A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, 3 : 323-327.
- 5) 鈴木仁 (1990) 骨軟部腫瘍の生物学的悪性度に関する研究: パラフィン包埋固定標本を用いた flow cytometry による DNA 分析. *日大医誌* 49 : p87-91.
- 6) 田辺亮, 及川直弘, 土岐利彦, 他 (1987) Paraffin 包埋組織を利用した婦人科悪性腫瘍の Flow Cytometry による DNA 解析. *日産婦誌* 39 : 87-91.
- 7) Tsushima K, Rainwater LM, Goellner JR (1987) Leiomyosarcoma and benign smooth muscle tumors of the stomach: Nuclear DNA pattern studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 62 : 275-280.
- 8) Tsushima K, Stanhope CR, Gaffey TA (1988) Uterine leiomyosarcomas and benign smooth muscle tumors: Usefulness of nuclear DNA patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 63 : 248-255.
- 9) Oshiro Y, Fukuda T, Tsuneyoshi M (1994) Fibrosarcoma versus fibromatoses and cellular nodular fasciitis: A comparative study of their proliferative activity using proliferating cell nuclear antigen, DNA flow cytometry, and p53. *Am J Surg Pathol* 18 : 712-719.
- 10) Atkin NB and Kay R (1979) Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. *Brit J Cancer* 40 : 210-221.
- 11) Blöndal T and Lindgren A (1982) Fluorescence cytophotometric measurements of nuclear DNA in adenocarcinoma of the lung: Relation of proliferative activity and DNA ploidy to prognosis. *Analyt Quant Cytol* 4 : 225-232.
- 12) Fontanini G, Pingitore R, Bigini D, Vignati S, Pepe S, Rugiero A, Macchiarini P (1992) Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with Ki-67 labeling and DNA flow cytometry data. *Am J Pathol* 141 : 1285-1290.

---

受付日 2000年12月26日