トルイジンブルー超生染の癌診断への応用

こやま たかし うきだ しつそう むらかみ もとまさ
 小山 高司・浮田 実三*・村上 元正**

はじめに

トルイジンブルーは DNA, RNA の核酸に親和性を有する異染色性色素で、核酸密度の高い悪性上皮を紫青色に濃染する。この性質を利用したトルイジンブルー・テスト（以下Tテストと略す）は、肉眼的に判別困難な早期の癌巣を鋭敏に捉え、またその範囲を明瞭に画き出して、癌診断におけるその秀れた特性は近時各科領域で高く評価されている¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

我々は耳鼻咽喉科領域における悪性腫瘍を疑わしめた43例につきTテストを施行し、病理組織学的所見および拡大鏡下に観察した局所の所見と対比して検討した。その結果に基き、癌の臨床検査法としてのTテストの特性、信頼性、有用性などにつき考察を加えたので、ここに報告する。

対象および方法

Tテストを施行した43例の部位別内訳を表1に示す。病変部位は手術用顕微鏡、鼻咽腔鏡、食道鏡などの下に詳細に観察し、またTテスト施行前後において局所のカラー写真撮影を行った。試験切除組織および摘出標本は病理組織学的に検索し、Tテストの結果と対比して検討した。

〔トルイジンブルー〕トルイジンブルー (To-

luidine Blue O) は硫チアン類に属する染色物質で、下記の構造式を有する⁸⁾。水およびアルコールにそれぞれ3.5% および0.5% まで可

溶である。原末は暗緑色であるが水溶液は帯青紫色を、アルコール溶液は青色を呈する。DNA, RNA の核酸と、また粘液多糖類と強い親和性を有するので、核および粘液の染色に適する。核酸の密度に応じて組織を異なる濃度の紫青色に染色し、いわゆる異染色性色素 (Metachromatic dye) に属する。

〔検査法〕まず目的とする検査部位を含む広い範囲を1%酢酸水で清掃して、粘膜表面に付着している粘液を除去する。通常、捲綿子に浸して数回、組織を損傷しない様に丁寧にうがいを併用する。乾いた捲綿子で水分を拭い去った後、2%トルイジンブルーを検査部位を中心

表 1

部 位	症 例 数
喉 頭	17
舌	6
咽 頭	4
口 蓋	4
鼻・副 鼻 腔	4
頬 部	3
口 唇	3
食 道	2
全 例	43

Supravital Staining Test with Toluidine Blue for Cancer Diagnosis : Application in Otolaryngology

Takashi Kayama, Jitsuzo Ukida and Motomasa Murakami

*国立岡山病院耳鼻咽喉科

**国立岡山病院研究検査科

図1. 舌癌症例. 舌中 1/3 左側面に2.0×1.5cmの潰瘍と硬結を形成 (矢印)

図2. Tテストにより腫瘍の輪郭が明瞭に示される (矢印).

図3. 口蓋癌症例. 口蓋中央左側に浅い小潰瘍形成 (矢印). 放射線治療施行中.

図4. Tテストにより潰瘍中心部が濃染される (小さい矢印) とともに主病巣よりやや離れた歯齦部に孤立した病巣 (大きな矢印) が存在するのが明らかとなる.

図5. 喉頭癌症例. 右声帯は不整に肥厚, 腫大して不動. 左声帯は肥厚し前部に小ビラン (矢印) があるが運動性は良好.

図6. Tテストにより右声帯は全体が濃染され, また左声帯ビラン部 (矢印) にも色素の付着がある.

図7. 図1, 2の症例. 扁平上皮癌. $\times 100$,
H-E 染色

図8. 図3, 4の症例. 歯齦部の生検組織.
Carcinoma in situ. $\times 100$, H-E 染色

図9. 図5, 6の症例. 左声帯ヒラン部の生検組織.
早期浸潤癌 $\times 100$, H-E 染色.

図10. 喉頭前側切除標本
Tテストにより左声帯腫瘍の輪郭が明示される
(矢印).

とするやや広い範囲に均等に塗布する。数10秒後、1%酢酸水を浸した捲綿子で以て染色液を拭い去る。同液によるうがい、洗浄などを併用してもよい。この脱色操作においても組織を損傷しない様配慮が必要である。正常上皮あるいは良性病変では色素のとり込みがなく、脱色操作により表面の色素はとり去られ呈色しない(陰性)。これに対して悪性上皮では表層より数列までの細胞内に色素がとり込まれて濃い藤紫

色を呈し、周囲の健常な上皮と明瞭に区別される(陽性)。注意すべきは炎症、ビラン、潰瘍などが時に呈色し、また特定の、呈色し易い解剖学的部位(舌背、口蓋、喉頭室など)が存在することである。しかしこれらによる偽陽性は色調、呈色の状態、陰性部位への移行状態などが真の陽性の場合とかなり異り、その鑑別は左程困難ではない。ここでは明らかに偽陽性による呈色と判断された場合は陰性の中に含めた。

検 査 成 績

病理組織検査の結果、Tテストを施行した43例の中31例が悪性腫瘍、他の12例は良性病変であった。悪性腫瘍31例は全例がTテスト陽性を示し、また良性病変12例は10例が陰性を、2例が陽性(偽陽性)を示した。すなわち、陽性率100%、的中率94%であった。偽陽性の2例は肥厚性喉頭炎および多発性喉頭ポリープの各1例で、前者は炎症の存在が、後者は不完全な粘液除去操作が偽陽性を呈した原因と推定された。悪性腫瘍31例の内訳は扁平上皮癌25例、血管肉

腫2例、単純癌、細網肉腫、横紋筋肉腫、乳頭腫悪性化の各1例であって、癌腫に限らず非上皮性悪性腫瘍についてもTテストは陽性を示した。扁平上皮癌25例中には上皮の異型肥厚、Carcinoma in situ、早期浸潤癌などの前癌状態ないし早期癌6例が含まれる。良性病変は炎症、上皮の単純肥厚、ロイコプラキア、良性腫瘍(ポリープ、乳頭腫、乳頭上皮腫、神経線維腫)などであった。

考 按

すべての癌腫において、早期診断は治療につながる重要な問題であって、その意義は極めて大きい。耳鼻咽喉科領域の癌腫、とくに喉頭癌、舌癌、食道癌などは早期に診断が下されれば、生命に対する予後が良好となるのみでなく、発声、構音、嚥下などの重要な機能を保存することができて、治療後における円滑な社会復帰が可能となり、患者の受ける恩恵には大なるものがある。

トルイジンブルーはDNA、RNAの核酸に親和性をもち、核酸の密度に応じて種々の濃度に組織を染色する。核酸の合成能が旺盛で之を多量に含む癌細胞あるいは異型細胞が多数存在する悪性上皮はトルイジンブルーによって濃染されて、周囲の正常な上皮と明瞭に区別される。異型細胞を伴う Atypical hyperplasia、

Carcinoma in situ などに対してもTテストは鋭敏に反応して陽性を呈し、早期癌あるいは前癌状態を検出する上で秀れた特性を有する。

耳鼻咽喉科領域における悪性腫瘍の診断に超生染を応用したものとしては、Schiller氏法による喉頭癌の診断がAlföldy³⁾により報告されている。Schiller氏法はヨード反応によって上皮内のグリコーゲンを定性的に検する方法で、グリコーゲンに富む正常上皮がヨードの滴下により赤褐色を呈するのに対して、腫瘍上皮はグリコーゲンを欠如し呈色しないことでもって判定する。しかしSchiller氏法は反応の鋭敏性がやや低くて異型上皮の検出に劣り、また悪性上皮に隣接する正常の部位が時に陽性を呈して、陽性部位と病変部位とが必ずしも一致しないなどの問題があり、ルチーンの癌診断法として普

及するには至っていない。これに対して、早期癌、前癌状態などに対するTテストの反応性は極めて鋭敏であって早期の癌診断に適し、また主病巣周囲に孤立して存在して見逃され易い小病巣の検出などにも役立つ(図3,4参照)。またTテストは悪性上皮の範囲を明確に示すので、広汎な病巣に対しても Multiple biopsy の施行は不必要となる。手術あるいは放射線治療後の長期 Follow up においては、瘢痕組織の存在がしばしば局所における再発を発見する上で障害となるが、Tテストによって確実な生検(Positive biopsy)を施行すべき部位が示されて、再発癌早期発見の機会が得られる。また放射線治療施行中あるいは施行直後における症例で、局所に炎症、浮腫などを伴い腫瘍を見分けることが困難な場合もTテストは有用である。

耳鼻咽喉科領域においては病巣部を直接あるいは間接的に視診し、また器具などによって直接病巣部に到達することが可能な場合が多く、Tテストの施行に適していると言える。とくに口腔、咽頭、口唇、鼻腔などの病巣に対してTテストは短時間にかつ容易に実施することができ、また直ちにその結果が判明するので、日常の外来診察においても気軽に施行できる。喉頭癌に対しては、近時ラリಂಗマイクロスコージーの普及に伴い、局所の詳細な観察、操作が可能となり、早期癌が発見される機会が多くなったが、Tテストを利用することによって更にその成績の向上することが期待される。一方治療面においても、両者の併用によって前連合、声門下、他側声帯などへの侵襲状態をより厳密につきとめることが可能となり、放射線治療、部分切除術、全摘出術などの的確な治療指針を立てる上で有力な手がかりが得られる(図5,6参照)。また舌癌、喉頭癌などの部分切除に際して、予めトルイジンブルーにより病巣を染色しておく、切除すべき範囲が明瞭に示されて手術操作を正確かつ容易とする(図1,2,10参照)。以上に述べたTテストの診断面および治

表 2

診 断 面

1. 判別困難な早期癌巣の検出
2. 確実な生検部位の決定
3. 孤立した小病巣の発見
4. 再発癌の早期発見

治 療 面

1. 切除すべき腫瘍範囲の明示
2. 的確な治療法の選択

療面における有用性を要約すると表2に示すようである。

Tテストの判定にあたり注意すべきは、炎症、びらん、潰瘍などの存在により、また解剖学的な部位によって呈色する場合のあることである。例えば、舌背には多数の乳頭が密に存在し、各乳頭間の凹窩や小溝には唾液、食物残渣、剝脱上皮などが常に貯溜して清掃され難く、これらが残存すると染色されて舌背は呈色する。また口蓋には多数の小唾液腺の開口があり、その表面は厚い粘液で常に覆れた状態であるので、粘液の除去が不十分な場合呈色し易い。喉頭では喉頭室および声門下の粘膜は粘液腺に富む円柱上皮で構成されていて、同様の理由で呈色し易い。しかしこれらの偽陽性では、真の陽性が濃い藤紫色を呈するのに対して青味がかかった色調を帯び、呈色の状態はよりビマン性であって、また周囲の陰性部位との境界が不明瞭であるなどの点より判別はある程度可能である(図2,4参照)。また我々の症例では経験しなかったが偽陰性の起り得ることに留意すべきで、例えば高度の角化を伴う癌の場合、角化上皮は細胞核を含まないので、その部分が陰性を呈することが顧慮される。またTテストは表層における腫瘍の存在を示すものであって、深部への浸潤あるいは粘膜下の側方浸潤に対する情報は本法によっては得られない。これらの特性を認識して実施 応用すれば、Tテストは癌の臨床検査法として診断、治療両面に有用であると思われる。

む す び

1. 耳鼻科領域における悪性腫瘍を疑わしめた症例43例につき、トルイジンブルー超生染による検査を施行した。

2. 悪性腫瘍の31例は全例が陽性を、良性病変の12例は10例が陰性を、2例が陽性（偽陽性）を示した。すなわち、陽性率100%、的中率94%であった。

3. 本法の特性および有用性につき検討し、下記の結論を得た。

1) 本法は実施簡便な、信頼性の高い検査法で、耳鼻科領域の悪性腫瘍の診断、とくにその早期診断に有用である。

2) 手術後あるいは放射線治療後の再発癌の発見に有用である。

3) 的確な治療法の適応を決める上で重要な参考となる。

4) 切除すべき腫瘍の範囲を明確に示して、手術操作を正確かつ容易とする。

5) ときに偽陽性を呈する場合があるがその判別は左程困難でない。

6) 深部への浸潤または粘膜下の側方浸潤に対する情報は本報では得られない。

稿を終るにあたり、資料の提供を受けた岡山済生会病院金谷真博士、岡山川崎病院菅田溥先生に深謝致します。本論文の要旨は第72回日本耳鼻咽喉科学会中国地方会および第26回国立病院療養所総合医学会において発表した。

文 献

- 1) Richart, R.M.: A Clinical Staining Test for the in Vivo Delineation of Dysplasia and Carcinoma in Situ. *Amer. J. Obst. & Gynec.* **86**: 703-712, 1963.
- 2) Niebel, H.H., et al.: In Vivo Staining Test for Delineation of Oral Intraepithelial Neoplastic Change: Preliminary report. *J. Amer. Dent. Assoc.* **68**: 801-806, 1964.
- 3) Alföldy, J., et al.: Frühdiagnose der Kehlkopfkarcinomen mit Hilfe der Schillerschen Jodprobe. *Z. Laryng. Otol.* **44**: 71-75, 1965.
- 4) Shedd, D.P., et al.: In Vivo Staining Properties of Oral Cancer. *Amer. J. Surg.* **110**: 631-634, 1965.
- 5) Shedd, D.P., et al.: Further Appraisal of in Vivo Staining Properties of Oral Cancer. *Arch. Surg.* **95**: 16-22, 1967.
- 6) Strong, M.S., et al.: Toluidine Blue in the Management of Carcinoma of the Oral Cavity. *Arch. Otolaryng.* **87**: 527-531, 1968.
- 7) Strong, M.S., et al.: Toluidine Blue in Diagnosis of Cancer of Larynx. *Arch. Otolaryng.* **91**: 515-519, 1970.
- 8) The Merck Index of Chemicals and Drugs. 7th edition, Merck & Co. Inc. 1960.

(原稿到着 昭和47年1月26日
別刷請求先 小山 高司
〒700 岡山市南方2丁目13-1
国立岡山病院耳鼻咽喉科)