原 著

子宮頸部の癌化過程における細胞間期核
クロマチンと染色体構成との関連性

北海道大学医学部産婦人科学教室

西谷 巖 下斗米啓介 菊地 徳博 一 戸 喜兵衛

はじめに

細胞核の形態学的変化を基盤として、癌細胞を同定しようとする現在の細胞診断学において、核 chromatin の配列構造の異常は、きわめて重要な指標となることは論をまたない。しかし、癌細胞核の研究は、主として、染色体、核膜および核小体などについて多くの知見が集積されているのにたいし、核 chromatin とくに間期核においてもっとも重要視されている heterochromatin の形態や機能に関しては、驚くほど不明の部分が多い。近年、細胞学的診断すなわち細胞診の普及とともに、良性悪性境界病変の細胞核に注目が集まっているが、客観的判定基準を確立する手段としても、核 chromatin の研究は、緊急かつ重要な課題であろう。

一方、癌は細胞の染色体疾患ともいわれ、分裂中期において、染色体の数、形態に何らかの変化を示すことが知られている。とくに、これが核内 DNA の担体であることも明らかとなり、chromatin と chromosome, euchromatin と heterochromatin, chromonema と chromocenter など多彩な表現にたいしても、何らかの理解を求めることが必要となっている。そこで、われわれは、大野によって巧みに描かれた schema (図1) を前提とするならば、染色体と密接な関係を有する euchromatin および heterochromatin との間には、何らかの相関を有するものと考え、核 chromatin の変動、染

色体構成の異常、核 DNA 量の変化および核の大小不同性をそれぞれ対比させ、その相関を求めることとした。とくに、このような変化が、子宮頸部癌化過程において、異形成、上皮内癌および浸潤癌の間にいかなる差異を示すかを検討した。

研究材料および方法

細胞標本は、子宮頸腔部の異常所見を呈する部位を直接コルポスコープ下に観察し、小型スパーテルを用いて検鏡的、選択的に擦過採取した。また、同一部位より組織片を採取し、2分割して H.E 標本作成と染色体検索に供した。組織片の採取は、従来から行われている Grünwaldt 鉗子では穿屈するため間質の混入が多いので、心臓血管手術用の鉗子を使用して採取した。染色体標

Structure of nucleus at interphase
(Schematic drawing)

(Ono 1961)

K : Karyosome
N : Nucleolus
C : Chromonema

図 1

Structures of Nuclear Chromatins in Interphase and Alterations of Chromosomes in Ca-in situ and Invasive Carcinoma of the Cervix

Iwao NISHIYA, Keisuke SHIMOTOMAI, Tokuhiko KIKUCHI and Kihyoe ICHINOE

Department of Obstetrics and Gynecology, Hokkaido University, Sapporo

昭和51年7月13日受付

本の作成は、組織を細切し、直接水処理おし潰し法によって行った。光顕による chromatin の詳細な観察は、これまでの光顕の分解能では不十分なことがわかったので、 $0.16\sim 0.24\mu$ の最大分解能を有することが確かめられた偏光暗視野斜光照明法(佐藤¹⁾)を用いて、chromatin をグレインのように観察した。染色体の数を分析した症例は、上皮内癌 15 例、浸潤癌 42 例であり、このうち、50 個以上の染色体分析例は、上皮内癌 5 例、浸潤癌 15 例である。染色体の分析可能な異型上皮は、2 例にとどまったため、細胞および組織標本に Feulgen 染色を施し、その核 DNA 量を測定し、上皮内癌、浸潤癌と比較検討した。核 DNA の透過測光は Carl Zeiss Jena 社製顕微分光光度計および Olympus MMSP-C を使用した。

研究成績

偏光暗視野斜光照明法によって Papanicolaou 標本上の扁平上皮型深層細胞を観察すると、正常間期核 chromatin は核内に広く分散し、その形態も様々である。グレインとしてとらえた chromatin 数は $45\sim 50$ 個くらいである(写真 1)。同一症例から得た染色体は正常細胞の 46 個を示す(写真 2)。

dysplasia の核 chromatin 数は、low degree と high degree の間で著しい差異をみる。すなわち高度の dysplasia では既に 80 個以上の chromatin グレインを示す核が増加している。しかし、perinuclear chromatin の増加が著しくないことが上皮内癌や浸潤癌との相異点である。

上皮内癌の間期核 chromatin 粒子は核内に充塞しかつ比較的均一になっていて、概算するとおよそ 90 個以上となっている。また perinuclear chromatin の増加が dysplasia に比し、しばしば明瞭に連続的に認められる(写真 3)。同一症例からえた染色体数は 88 個を示した(写真 4)。

浸潤癌細胞の chromatin 形態も上皮内癌のそれと比較的一致し、多数の核に $80\sim 100$ 個の chromatin 粒子を算定することができる。角化を伴った分化型扁平上皮癌細胞の核は chromatin が著増し、その数の概算もできない。このような症例の染色体分析はほとんど不可能であるが、mitotic spindle の増加として認めることができる。

dysplasia と診断された症例において、染色体の分析は充分でなかったため、組織標本上の細胞核 DNA 量について上皮内癌と対比してみた。すなわち高度の dy-

写真 1 正常の扁平上皮より採取した
旁基底型細胞 $\times 4,500$

写真 2 写真 1 と同一症例

splasia の深層細胞核 DNA 量分布は高倍数域に拡がり、上皮内癌や浸潤癌の組織を捺印し、Feulgen 染色を施した細胞標本について核 DNA 量分布をみると(図 2)、軽度 dysplasia では 2 倍体から 4 倍体域に $65\sim 75\%$ の細胞が分布するが、4 倍体以上の細胞は 15% 以下である。しかし高度の dysplasia では 4 倍体以上に分布する細胞が $38\sim 74\%$ と増加し、やはり上皮内癌や浸潤癌と区別できない。

浸潤癌における染色体数変異には 2 つの pattern (荒谷⁴⁾) が認められる(図 3)。1 つは hyperdiploid に主な mode をもつ pattern で 15 例中 9 例である。他方は 2 倍体域から 4 倍体域以上に広く分散する no mode pattern で 15 例中 6 例に認められた。上皮内癌においても同様の pattern として認められた。

chromatin 数と染色体数との関係を見ると、一般に no mode pattern においては(図 4)、染色体が高倍数域に多く分布するものほど、chromatin 数も 80 個以上に

写真 3 上皮内癌症例より採取した第Ⅲ型悪性細胞 (R. Graham) $\times 4,000$

写真 4 写真 3 と同一症例

増加しているものが多く、ほぼ比例的相関を認める。しかし、hyperdiploid pattern においても、やはり chromatin 数が 80 個以上のものが多く認められ明らかな相関はみられず、この pattern の細胞の局在部位と擦過採取細胞との間にいかなる関係があるか興味深い。

以上の成績にさらに Papanicolaou 標本上の異型および、悪性細胞の Karyometry を行って核径の増減と染色体数変異との相関を求めると、染色体数 mode が高倍数域に偏在するものほど細胞は大型となる傾向が強くなり、またそれとともに anisokaryosis も著明となることが確かめられた。

図 2 子宮頸部の捺印細胞標本に Feulgen 反応を行い、軽度異型上皮、高度異型上皮および上皮内癌の細胞核 DNA 量を測定し、Histogram とした。

図 3 子宮頸部浸潤癌における染色体分布の 2つの pattern を示す (荒谷)。

図 4 子宮頸癌細胞におけるクロマチン数の増加と染色体 mode との相関を示す。

考 按

悪性細胞判定に際して chromatin の形態的变化は最も注目される所見であるが、細胞の採取法や細胞のおかれる周囲の組織環境の差異によって様々な様相を呈し、最近では特に固定液の種類、固定法の違いによっても、それぞれクロマチンの形態、凝集性に特徴的な差異のあることが注目されるようになってきている。したがって、これまでの光顕によって観察している核縁や核内 chromatin 所見が果たして本来の姿としてとらえられているかどうかという疑問が生じてくる。本報告で使用した偏暗斜法は、これまでの光顕のおよそ 2 倍の分解能を有することが既に証明されているが、このことに関しては、培養 Hela 細胞のクロマチンと人の子宮頸部正常細胞および扁平上皮癌細胞とを対比して観察した佐藤¹⁾の報告をみるだけである。

本法の特徴は、核 chromatin の染色の有無に関係なく、詳細に核 chromatin 構造を観察できることであり、光顕的に Papanicolaou 標本上で、perinuclear chromatin が増強して、核内がむしろ明るくみえる悪性細胞核でも偏暗斜法でみると、実際に核内構造は均一性過密に顆粒状の chromatin が充塞しているのを識別でき、chromatin を数量的にも把握できる場合がしばしばある。これまでの光顕的観察で境界病変の chromatin 所見を比較する場合、核の形態的所見を出現頻度の差としてとらえるのが限界といわれ(西谷^{2,3)})、その本質的

差異についてはいまだ説明されていないが、最近、核 chromatin は DNA と核蛋白の結合した D-N-P であることが実験的にも証明されており、また染色体は DNA を包含し、調節している器のようなものと考えられており、一般に悪性化過程の chromatin と染色体変動とは密接な関係のあることが容認されている。さらに組織標本上の核 DNA 量の変動をみると、高度の dysplasia の段階で既に上皮内癌と識別できない分布 pattern をもっていることは既に報告されており(戸⁴⁾)、癌化の過程は、光顕的に chromatin 形態異常として識別される以前に核 DNA 量の変動に依存した変化としてとらえられることを示唆している。したがって、われわれは、塗抹細胞標本核 DNA 量と組織標本上の細胞核 DNA とを対比し、偏暗斜法によってみた塗抹細胞の chromatin 数との関係を検討した。

塗抹細胞 DNA 分布をみると mild dysplasia では全く異なった pattern をとり、すでに高倍数性細胞が増加して、35%~75% が 4n 以上に分布する点は、Richart^{5,6)}らを始めとして多くの報告にみられる組織標本上の DNA 量分布 pattern ときわめて近い値を示し、やはり高度の dysplasia の段階で上皮内癌と区別できない一つの spectrum な段階を思わせる。このことは、これまでの組織標本による DNA 量の問題点として、切片による核の厚さ、核の重さなり等から生ずる測定値の誤差について考慮しなければならないという疑点があるにもかかわらず、核容積からくる誤差以前の段階で、まず Feulgen 染色がどの程度の精度をもち、何を表現したものであるかという検討と同時に、MSP 測定法の限界がどの程度かという点に帰結すべきかと思われる。すなわち、最近核酸の微量分析をすべく新しく開発された方法に螢光染色法があるが、Rigler⁷⁾、山田⁸⁾、田中⁹⁾らによる Acridine orange 法では一致して Feulgen 染色法の 100 倍近い感度を有すると述べている。さらに Caspersen¹⁰⁾は同系の色素である Quinacrine mustard を用いて、染色体の同定をも可能にしたが、これらの染色機構についても、今なお説明が十分でなく、DNA の中の特定の構成要素と結合するだろうという問題は今後の究明に待つ面が多い。しかしながら簡単な塗抹標本によって、軽度の dysplasia 段階で、正常扁平上皮と明らかに DNA 量分布 pattern の差としてとらえられること、また高度の dysplasia と上皮内癌との組織学的鑑別が必ずしも容易でない現今において、細胞レベルの腫瘍性変化を組織レベルより早期に客観的にとらえることができる点は、通常の診断を基礎的に裏付けする意味で Feulgen 染色法の価値は少しも失するものでないと思われる。

また偏暗斜法によって観察した核内顆粒状 chromatin は, heterochromatin であろうと推定されながら, その本態に関しては不明であるが, severe dysplasia の段階で著しい数的増加をみ, 80 個以上の粒子をもった核が多くなり, 形態的にも上皮内癌と酷似する点は, あたかも DNA 量分布 pattern にみた Ca. in situ と severe dysplasia との関係と同じで, DNA 量と密接な関連のあることを示している。

子宮頸部の悪性病変における染色体の異常な数的増加と核 DNA 量の高倍数性細胞の著増との間に何らかの相関があるだろうという点に関してはいくつかの追究がなされているが, それらの mode に関しては, 必ずしも一致した結論は得られていない。一般に染色体数 mode をみると, 大多数の報告例で, deploid range にあるとするものが多いが, $2n$ をこえて, $3n \sim 4n$ 付近にわたって, 広く分布するという報告もある。われわれの浸潤癌, 上皮内癌についての染色体分布では, 既に一戸⁴⁾らが報告したように, 両者において2つの pattern に集約される。すなわち, hyperdiploid pattern と $2n \sim 4n$ に分散する no mode pattern である。しかし, 染色体数と DNA 量分布との関係については比較的報告が少ないが, 小島¹¹⁾, 三宅¹²⁾らの症例では 75~80% の症例で著しい相関をみると述べながらも, なお比例的相関のみられない症例のあることも認め, この両者の間に直接的な判定をくだすことは困難であるとしている。一戸⁴⁾らは染色体について2つの pattern を指摘したが, その各々と, DNA 分布 pattern との関係についても特記すべき特徴は見出されていない。

同様に偏暗斜法による chromatin 粒子と染色体数とを対比すると, 一般に染色体数が no mode pattern の症例では, chromatin 数が 80 個以上の細胞が多くなり比例的相関を示すことが確認されるが, 染色体数 mode が hyperdiploid pattern の症例でも, 塗抹標本上の細胞の chromatin 数が 80 個以上に著増した細胞が多い点は, 細胞の由来する局在部位による差異も推定され擦過採取された Papanicolaou 標本上の細胞と染色体分析された細胞とが正しく対比されているかどうかという問題を提起する。すなわち染色体観察の直接おし潰し法は, 腫瘍組織全層を細切して細胞を採取するのに対し, 擦過細胞標本は, せいぜい中層細胞までの脱落細胞が多く, 明らかに多彩な細胞質, 核変性所見を伴ったものの出現頻度が高く, この点についてわれわれは, 組織スタンプ標本上の細胞を偏暗斜法で検討中である。

一戸⁴⁾は, 癌組織の分裂細胞のうちでも, 癌の本質を継代伝えていく stem cell は, 正常の diploid cell に

近い hyperdiploid の細胞であろうと考え, 高倍数性細胞は遠からず死滅するものであろうと論じ, また野嶽¹³⁾らの奇胎組織培養による実験でも, diploid 域の細胞に mitosis が最も多いことを報告しているが, われわれの成績でも, 一般に扁平上皮癌組織や奇胎組織を問わず, 多倍体 DNA 量を含む大型核異型細胞や, 高度の anaplastic な cytotrophoblast の H^3 -thymidine の up take をみると, Labelling Index や H^3 -thymidine の グレイン数が著明に低下し, ひいては全くその up take を示さなくなってしまう事実は, 高倍数性染色体の細胞が stem cell からはずれた細胞であることを推定させるが, さらに染色体の出現頻度も, 組織採取後の時間的推移いかんによって, 大きな差があり, 染色体個々の重なりや mitotic spindle 様の変化が多数混在し, 分析不能の細胞が増加してくることは日常経験するところであるが, 一般に通常 mitosis のみられない組織でも, colcemid を投与すると分裂像の異常な増加がみられるともいわれ, mitotic duration を考慮に入れないかぎり, 細胞の増殖性は論すべきでないとの見解もあるごとく, われわれが通常分析不能として除外している顆粒状染色体や spindle 様染色体が果たして単なる変性を示すものかどうか,あるいはdiploidに近いものかどうかという点が究明されないかぎり, 癌の stem cell に関する染色体数を論じたい面があると思われる。同様に染色体 mode の hyperdiploid pattern と偏暗斜法でみた chromatin 粒子数との不一致については, 細胞の由来する局在部位および, stem cell の違いとしてとらえることができるかも知れない。

結 び

われわれは, 核蛋白密度の高い heterochromatin (chromocenter) と染色体の数的変異や核 DNA の量的異常と関連を有する euchromatin (chromonema) との相関を明らかにすれば, 子宮頸部の境界病変の診断において, 有力な傍証が得られると考え, 0.24μ までの分解能を有することが確かめられた偏暗斜法を利用して, 本研究を行った。

本研究は, 第12回日本臨床細胞学会総会シンポジウムにおいて発表した。また, 第4回国際細胞学会議において発表した。

Summary

A relationship between changes in chromatin stru-

cture and chromosomal abnormalities has become of interest. Whereas detailed observation of nuclear chromatin in interphase was difficult in hematoxylin stained specimens by optical microscope and, for this reason, has been variously described as reticular or coagulated.

The study demonstrates that the chromatin pattern of normal and malignant cervical cells was observed clearly as chromatin grains by the dark filled, oblique illumination method using polarized monochromatic light. Chromosomes were determined from biopsy by a direct squash technique in 15 patients with intraepithelial carcinoma and 42 patients with invasive carcinoma of the cervix.

Results reveal the following :

- 1) The chromatin pattern of a normal cell is observed as a mass of grains which have various sizes and forms by this method. The grain numbers between 40 and 50 are most frequent.
- 2) On the other hand, chromatin pattern of the malignant cell is observed as a tight mass of grains which have definite size and form, a pattern which seems to be similar to the undifferentiated cells.
- 3) The grain numbers of the malignant cells increased widely from 60 to 100 in most cases.
- 4) In metaphase of malignant cell populations, the chromosome number range was found in two patterns; the first pattern is a clear hyperdiploid mode and other pattern, in addition, is a wide chromosomal range from 40 to excess of 100 which is not a true mode.

文 献

- 1) 佐藤昭彦：細胞核クロマチンの微細構造。日臨細胞誌, 6 : 78~81, 1967.
- 2) 西谷 巖：細胞診における悪性細胞判定法。臨床婦産, 21 (3) : 244~245, 1967.
- 3) 西谷 巖, 他：子宮頸部の癌及びその前段階病変の細胞学的判定基準と組織像との関連性。臨床病理, 19 : 663~669, 1971.
- 4) 一戸喜兵衛, 他：第 22 回日産婦産題報告。1970.
- 5) Richart, R.M. et al. : Chromosome number and morphology of a human preinvasive neoplasm. Science, 144 : 65~67, 1964.
- 6) Richart, R.M. et al. : The chromosomes of human intraepithelial neoplasia; Report of 14 cases of cervical intraepithelial neoplasia and review. Cancer Research, 26 : 60~74, 1966.
- 7) Rigler, R. : Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange. Acta Physiol. Scand., 67, Suppl., 267 : 1~122, 1966.
- 8) 山田 喬, 他：剝離細胞診の基礎的問題。最新医学, 23 : 606~622, 1968.
- 9) 田中一静：Fluorospectrophotometry による塗抹細胞診断の客観化に関する研究。日臨細胞誌, 10 (2) : 155~173, 1971.
- 10) Caspersson, O. et al. : Quantitative cytochemical studies on normal, malignant, premalignant and atypical cell populations from the human uterine cervix. Acta. Cytol. (Philad.), 8 : 45~59, 1964.
- 11) 小島吉雄：人癌における DNA 量と染色体。日本臨床, 19 : 2295~2303, 1967.
- 12) 三宅清平：子宮頸癌の細胞学的研究（特に染色体と核 DNA 量を中心として）。岡山医学雑誌, 79 : 805~817, 1967.
- 13) 野嶽幸雄：Trophoblast の組織培養。産婦の世界, 17 (5) : 427~443, 1965.
- 1) 佐藤昭彦：細胞核クロマチンの微細構造。日臨細胞誌,