原 著

Flow-Cytometry による腺癌細胞と
扁平上皮癌細胞の鑑別について

東京慈恵会医科大学第2産婦人科教室

岩田 正晴 佐々木 寛 坪井 透

腺癌細胞は扁平上皮癌細胞に比し核小体が著明であることに注目し、Flow-Cytometry (Bio/physics 型) を用い、核を DNA、核小体を RNA とし DNA/RNA の比で現すことにより、FMF 上の腺癌細胞の特徴を把握するとともに扁平上皮癌との鑑別を行ってみた。

すなわち、Acridine Orange を用い細胞内 DNA と RNA の同時蛍光染色を行うのであるが、これにはまず核の double strand RNA を single strand にするための denaturing が必要であり、このため Ehrlich 腹水癌細胞を用い基礎的に検討を行った。

その結果、Traganos の方法は未固定の状態では denaturing は可能であるが、臨床材料によるアルコール固定の場合には不向きで、これはリン酸緩衝液で2回洗浄することにより denaturing が可能となり、FMF 上 DNA, RNA とも満足のいく pattern を示した。そこで腺癌と扁平上皮癌の培養細胞を用い RNA denaturing による FMF 解析を行ったところ、腺癌では X 軸 (Red: RNA) 側に、扁平上皮癌では Y 軸 (Green: DNA) 側に細胞の分散が認められ、また子宮頸部腺癌と扁平上皮癌細胞との比較においてもほぼ同様の傾向を観察し得たことより、FMF による両者の鑑別は可能であると思われた。

Key words: Squamous carcinoma cell — Adeno carcinoma cell — Flow-cytometry —
RNA denaturation — Differential diagnosis

緒 言

Flow-Cytometry は従来より癌の篩別診としての研究^{3,10,12,15)} がなされているが、同じ癌細胞でも組織学的背景を知りうるための検討は、ほとんどされていない。

そこでこのような組織像の違いを鑑別しうるか否かを知る目的で、子宮頸部腺癌の細胞像の特徴として核小体の多いことに注目し、Bio/physics flow-microfluorome-

try (次下 FMF と略) による培養腺癌細胞の観察を行うとともに腺癌細胞と扁平上皮癌細胞の鑑別を基礎的、実験的に行い、さらに臨床例についても観察を行った。

研究方法ならびに材料

1. Ehrlich 腹水癌細胞を用いた DNA・RNA 同時
蛍光染色法の検討

DD 系マウス腹腔内に Ehrlich 腹水癌細胞移植後 10 日前後の細胞を用い、RNA denaturing の検討と Acridine Orange (AO と略) 染色による FMF の観察を以下のごとく行った。

すなわち、表 1 は Traganos^{16~18)} による未固定検体の場合の RNA denaturing と AO 染色法であるが、これはアルコール固定の場合には不向きであるため検体処理に関し表 1 に示した 3 つの実験を行い、FMF 上の

Flow cytofluorometric analysis of adeno carcinoma cells and epidermoid carcinoma cells

Masaharu IWATA, M.D., Hiroshi Sasaki, M.D., Tohru TSUBOI, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, The Jikei University School of Medicine, Tokyo

論文別刷請求先 ㊟105 東京都港区西新橋 3 の 25 の 8 東京
慈恵会医科大学第2産婦人科教室

昭和 57 年 10 月 12 日受付

表 1 エールリッヒ腹水癌細胞

実験1			実験2			実験3		
リン酸緩衝液作製 ($10^5 \sim 10^6$ 個/ml, 浮遊液)			50%エタノール固定			50%エタノール固定		
↓			リン酸緩衝液洗浄 2 回			リン酸緩衝液洗浄 2 回		
↓			↓			↓		
A液処理 15 分			1,000 rpm 5 分遠沈 (上澄除去)			A液処理 15 分		
↓			↓			↓		
B液処理 10 分			RNAase 0.2 ml (1 mg/ml Sorenson 液)			B液処理 10 分		
↓			↓			↓		
40 μ ナイロンメッシュ			Propidium Iodide 液 10 ml (0.05 mg/ml 1.12% クエン酸ナトリウム液)			40 μ メッシュ		
↓			↓			↓		
FMF (Green Red 測定)			40 μ ナイロンメッシュ			FMF (Green Red 測定)		
			↓					
			FMF (Red 測定のみ)					
A液			B液					
Triton $\times$ 100	0.1%		Acridine Orange	1 mg/ml	0.6 ml			
NaCl	0.15 N		EDTA-Na	10^{-3} M				
HCl	0.1 N		NaCl	0.15 N				
EDTA-Na	10^{-3} M		Phosphate citrate buffer	0.1 N				

pattern の解析を行い、いずれが適しているかを検討し、以下の観察を行った。

2. 培養細胞の観察

野沢（慶応大学）による人子宮内膜癌細胞株（SNG-M）ならびに扁平上皮癌細胞株（SKG-II）を用い、Ham F-12, 10% fetal calf serum 加にて継代培養し、対数増殖期に 0.25% trypsin で 10 分間処理し、single cell suspension としたのち 50% アルコールで固定し、0~4°C で保存し FMF による解析を行った。

3. 臨床材料の観察

子宮頸部扁平上皮癌および頸部腺癌症例の子宮頸部病巣より木製スパーテルで細胞採取を行い、50% アルコールで固定し、0~4°C で保存し、培養細胞と同様に FMF 解析を行った。

研 究 成 績

1. DNA・RNA 蛍光染色法の FMF 解析

まず Darzynkiewicz ら⁵⁻⁹⁾ および Traganos ら¹⁶⁻¹⁸⁾ の方法による RNA denaturing であるが、これが正しく行われているか否かをみるために表 1 の実験 1 と 2 を行った。すなわち、実験 1 は Ehrlich 腹水癌細胞を未固定の状態に RNA denaturing を行ったもので、実験 2 は同じ細胞を 50% エタノールで固定を行い、RNase 処理後 Propidium Iodide (PI と略) 染色を行ったもので

ある。両者の FMF による DNA pattern は図 1a および b に示すごとくで、ほとんど同じ pattern を示している。したがって本研究における RNA denaturing は正しく行われていることが確認された。

そこで次に臨床例の資料を用いる場合にはアルコール固定であるため、アルコール固定による検体の RNA denaturing につき検討を行った。

すなわち、Ehrlich 腹水癌細胞を未固定とアルコール固定に分け、それぞれを表 1 に示す A 液および B 液処理を行い AO 染色し、DNA と RNA とを別々に測定してみると図 2 に示すごとくで、下段左右に示すアルコール固定の場合と上段左右に示す未固定の場合とでは、DNA および RNA とその pattern が異なり、アルコール固定検体では本法は不向きと認められた。そこで次に 60°C に加熱し、熱処理²⁾ による方法を行ってみると、図 3 に示すごとく、左側上下に示す DNA はほぼ正しく測定されているが、右側上下に示す RNA では熱処理により RNA は著しく低下した蛍光を示すのみで、熱処理による方法は DNA・RNA 同時解析には不向きと認められた。しかし以上のごとく RNA denaturation が良く行われないのは、アルコールの存在が障害になっていると思われるので、この点に留意し、表 1 実験 3 に示すごとくリン酸緩衝液で 2 回洗浄後 A 液・B 液処理を行ったところ、図 4 に示すごとく DNA・RNA とともに満足のゆく定量性をもたらすことが示された。

図 1 左図：未固定エールリッヒ腹水癌 Acridine Orange 染色の Green (DNA) パターン
右図：アルコール固定エールリッヒ腹水癌の Propidium Iodide 染色の DNA パターン

図 2 左上図：未固定検体 Acridine Orange 染色 Green 測定
右上図：同上の Red 測定
左下図：アルコール固定検体 Acridine Orange 染色 Green 測定
右下図：同上の Red 測定

2. DNA・RNA 同時測定による腺癌細胞と扁平上皮癌細胞の FMF pattern

1において DNA・RNA 蛍光染色法について基礎的に検討を行い、アルコール固定検体ではリン酸緩衝液で2回洗浄することにより、DNA・RNA とも同時に染色することができ、しかも定量性を発揮しうるものとして解決されたが、培養細胞あるいは臨床材料による検体では裸核処理を行う必要があり、表2に示すごとくトリプ

シン処理後50%アルコールで固定し、表1実験3と同じ方法を行い、FMFによるDNA・RNA同時測定を行った。

1) 培養細胞による観察

表2のごとき方法でAO染色を行い、FMFによりDNA・RNA同時2元測定を行うと図5のごとくである。すなわち、本法はAO染色によりGreenに染まるDNAをY軸側に、またRedに染まるRNAをX軸側

図 3 左上図: 未固定検体 Acridine Orange 染色 Green 測定
 右上図: 同上の Red 測定
 左下図: アルコール固定 60°C 加熱 Green 測定
 右下図: 同上の Red 測定

図 4 左上図: 未固定検体 Acridine Orange 染色 Green 測定
 右上図: 同上の Red 測定
 左下図: アルコール固定, リン酸緩衝液洗浄後検体 Green 測定
 右下図: 同上の Red 測定

表 2

検 体
↓
トリプシン処理
↓
50%アルコール固定
↓
リン酸緩衝液洗浄 2 回
↓
Pepsin 処理 15 分 37°C
↓
A液処理
↓
B液処理
↓
ナイロンメッシュ 40 μ
↓
FMF (Red, Green 2 元測定)

図 5 Green Red 2 元測定による培養株比較,
横軸 Red, 縦軸 Green
上図: SKG-II 扁平上皮癌株
下図: SNG-M 腺癌株

図 6 Green Red 2 元測定による人検体比較,
横軸 Red, 縦軸 Green
上図: 人子宮頸部扁平上皮癌擦過スミア
下図: 人子宮頸部腺癌擦過スミア

に現れるようにしたもので、まず FMF 測定に有利な培養細胞を用いたものである。図 5 上は扁平上皮癌株 (SKG-II) の FMF pattern で、下は腺癌株 (SNG-M) のそれであるが、測定された細胞の分散は扁平上皮癌は DNA (Y 軸) 側に、また腺癌は RNA (X 軸) 側に傾くことが観察された。

2) 臨床材料による観察

子宮腔部より直接採取した扁平上皮癌細胞と腺癌細胞を 1) と同様の方法と理論により、その測定を行った。すなわち、図 6 上は扁平上皮癌例、下は腺癌例であるが、培養細胞における pattern と比較すると両者の分散の違いはそれほど顕著でないが、やはり扁平上皮癌例は Y 軸側に傾いているのに反し、腺癌例では X 軸側に傾いていることが観察された。

考 案

Flow-Cytometry は癌か否かの鑑別には本邦においても一応の成果が報告^{3,10-12,14,15)}されており、とくに DNA 分布よりみた細胞動態解析の検討が行われているが、腺癌細胞の認識、とくに扁平上皮癌細胞との鑑別に関しては、その検討がほとんどなされていない。そこで本研究では FMF による腺癌細胞の特徴を把握するとともに腺癌と扁平上皮癌との違いについて検討を行った。

まず婦人科領域における細胞診上の腺癌細胞と扁平上皮癌細胞との鑑別点をみてみると表3のごとくに要約しうるものと思われ、このうち、とくに腺癌細胞に核小体が多いことに注目し、核を DNA、核小体を RNA とし FMF を用い DNA/RNA の比で表すことにより本研究をスタートさせた。そこでこれらを観察するための DNA・RNA 二重染色法につき若干の考察を行った。

この二重染色法には FITC/Propidium Iodide および Acridine Orange などを用いた方法があるが、今回われわれは Darzynkiewicz ら⁵⁻⁹⁾および Traganos ら¹⁸⁾の方法に準じ AO 染色を行った。そこでこの AO を用いた同一細胞の DNA・RNA 二重染色法であるが、核内 DNA を AO の蛍光により定量する場合には核内の double strand RNA が問題となってくる。そこでこの double strand RNA を denaturation し、single strand RNA とし、DNA と区別する必要がある。これらに関しては図1に示したごとく、AO 染色による DNA pattern と RNA を消化し PI 染色を行った DNA pattern とが同一であることより、denaturation が正しく行われており、しかも図2上段のごとく DNA 量と RNA 量とも満足のいく定量性をもたらすことができた。しかしこれらは、固定資料の場合には不向きであることより、アルコール固定の場合につき若干の検討を行った。すなわち、Triton X, EDTA-Na, による膜の変化と RNA の denaturation, さらに 0.1 N. HCL による核タンパクの denaturation な

どの効果がアルコールの固定によって阻害されるものと思われ、この阻害現象が膜あるいは核タンパクの変化によるものか否かを検討したところ、この現象は主として細胞の収縮や膜の変化に基づくもので、denaturing に関しては可逆的な変化であり、リン酸緩衝液で十分洗浄し、アルコールを除去し水戻しすることにより、図4に示すごとくその定量性を発揮することが判明した。したがって従来行われていた Adams ら^{1,2)}による熱処理の方法では図3のごとく DNA・RNA 同時測定を行うには定量性に乏しいうらみがあり、表1、実験3に示した方法を用いれば、簡便でしかも DNA・RNA の両者の定量性が得られ、今後各方面に利用しうるものと思われる。しかし Darzynkiewicz ら^{7,8)}も指摘しているごとく、A 液、B 液の処理時間を正確に行う必要があり、このような煩雑さを考えると DNA のみの定量では RNase 処理、PI 染色の方が良いかも知れない。

以上のごとく AO 染色による DNA・RNA の定量性の問題に関し検討を加え、FMF の pattern の上では固定資料の場合でも未固定検体と比較しほとんど差のないことから、培養細胞ならびに臨床材料による DNA・RNA 同時測定の観察を行い、すでに成績(図5および6)に示した結果を得た。

すなわち、同時測定による細胞分散は腺癌細胞は RNA 側に、また扁平上皮癌細胞は DNA 側に傾き、これを模図で示すと図7のごとく、FMF の pattern では腺癌と扁平上皮癌では異なる所見が得られ、これは臨床材料でも同様であった。そこで本研究はすでに述べたごとく腺癌は RNA が多いということでスタートしたが、確かに AO 染色による腺癌は FMF 上 Red 側、すなわち RNA 側に傾くことより、扁平上皮癌に比し核内 RNA が多いことが示唆される。そこで図6に示した腺癌と扁平上皮癌例に対し、RNase 処理後同様に測定を行ったところ、図8に示すごとく腺癌は DNA 側にその分

表3 Differential diagnosis between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

Nucleus	Nucleolus
	Chromatin
	Anisokaryosis
	Nuclear overlapping
Cytoplasm	Mucin
	Nuclear deviation
	Thickness

図7

図 8 図 6 の検体の RNase 処理による変化

散が認められ、しかも扁平上皮癌のそれより DNA 側により近づいている。このことは腺癌は RNA が多く、このため RNA の消化により扁平上皮癌より変化が強く現れたものと解釈され、腺癌が X 軸側に傾くのは核内の RNA の存在に基づくことが明らかであり、このようなことからすると FMF で腺癌と扁平上皮癌の鑑別は可能と思われる。しかしここで問題となるのは、臨床材料を用いる場合、repair cell や metaplastic cell あるいは leucocyte などの混在と核小体のあまり著明でない腺癌の存在である。しかし前者に対しては現在検体処理法が検討されており、これにより解決される可能性はあるが、後者のような例では本法を行っても不可能で、ほかの蛍光染色法を用いる必要があり、今後に残された課題である。

したがって本法によってすべての腺癌例が適応しうるとは限らないが、ある特殊例を除けばその特徴を FMF pattern より読み取ることができ、その有用性は高いものと思われる。

結 語

Ehrlich 腹水癌細胞、人子宮内膜癌細胞株 (SNG-M)、扁平上皮癌細胞株 (SKG-II) ならびに腺癌および扁平上皮癌の臨床材料を用い DNA・RNA 同時蛍光染色による FMF 解析を行い以下の結果を得た。

1. RNA denaturing はアルコール固定検体でもリン酸緩衝液で洗浄することにより可能となった。
2. 培養細胞および臨床材料による腺癌細胞と扁平上皮癌細胞の FMF 上の細胞分散は腺癌は RNA (Red) 側に、扁平上皮癌は DNA (Green) 側に傾き、FMF により両者は鑑別しうるものと思われた。
3. 上記検体の RNA 消化後の FMF pattern より、腺癌細胞は扁平上皮癌細胞に比し RNA が多いことが、FMF によって確かめられた。

本研究の一部は昭和 54, 55 年度厚生省がん研究助成金による“自動細胞診断システムの確立に関する研究班 (主任・天神義夫)”において報告した。

Summary

From the fact that adenocarcinoma cells have more distinct nucleoli than those of squamous cell carcinoma and with the appliance of flow-microfluorometry (biophysics type), an experiment was performed in order to obtain some characteristic features of adenocarcinoma cells on FMF as expressed by DNA/RNA ratio, where DNA stands for the nucleus and RNA for the nucleolus, and further to distinguish the former from the latter.

While this work involved simultaneous fluorescent staining of intracellular DNA and RNA, it was first necessary to change the double-strand RNA into the single-strand one by denaturing. This was employed on Ehrlich ascites carcinoma cells.

The result was that denaturing by Traganos method could be made so long as the cells remained nonfixed, but was hardly possible in cells which had been fixed with alcohol as is usually the case with laboratory samples. By washing the cells with PBS twice, however, the denaturation was achieved and both DNA and RNA exhibited satisfactory patterns on FMF. Thereupon, after RNA denaturing, cell cultures of both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma were prepared and put to FMF analysis. Adenocarcinoma cells were observed together toward the X axis (Red: RNA) and those

of the squamous cell carcinoma toward the Y axis (Green: DNA). A similar tendency was also noted when the cervical adenocarcinoma cells were compared with those of squamous cell carcinoma. Thus, it was considered possible to differentiate these two kinds of cells by FMF.

文 献

- 1) Adams, L.R.: Acridine Orange staining of epithelial cell in strong salt solution, *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 492~494, 1974.
- 2) Adams, L.R.: Staining for the cytograph and cytofluorograph, *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 965~975, 1977.
- 3) 天野悦男, 杉田道夫, 杉下 匡, 天神美夫, 石田礼載, 阪口耀子, 佐藤和子: Flow-cytometry による子宮頸部正常扁平上皮細胞の核 DNA 量, *日臨細胞誌*, 21: 167~175, 1982.
- 4) Crissman, H.A., Oka, M.S., Steinkamp, J.A.: Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells, *J. Histochem. Cytochem.*, 24: 64~71, 1976.
- 5) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Thermal denaturation of DNA in situ as studied by Acridine Orange staining and automated cytofluorometry, *Exp. cell Res.*, 90: 411~428, 1975.
- 6) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Conformation of RNA in situ as studied by Acridine Orange staining and automated cytofluorometry, *Exp. cell Res.*, 95: 143~153, 1975.
- 7) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: DNA denaturation in situ, Effect of divalent cations and alcohols, *J. cell Biol.*, 68: 1~10, 1976.
- 8) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Lymphocyte stimulation, A rapid multiparameter analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 73: 2881~2884, 1976.
- 9) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T., Friend, C. and Melamed, M.R.: Nuclear chromatin changes during erythroid differentiation of Friend virus induced leukemic cells, *Exp. cell Res.*, 99: 301~309, 1976.
- 10) 井上勝一, 宮本 宏, 阿部庄作, 村尾 誠, 遠藤隆志, 荒川三紀雄, 水部重孝, 桑島俊彦, 赤間正義, 田村浩一: ヒト癌細胞の核 DNA の測定——顕微分光測光法と Flow-cytometry の比較を中心として, *日臨細胞誌*, 21: 1~7, 1982.
- 11) 岩間正文: Impulse Cytophotometer (I.C.P.) による小児白血病細胞の増殖動態の検討とその応用, 第2編, *日癌治*, 16: 56~63, 1981.
- 12) 久保田浩一, 佐々木 寛, 杉下 匡, 天神美夫: Impulse cytophotometer (I.C.P.) による子宮頸部各種病変に対する DNA パターンの動態について, *日臨細胞誌*, 19: 438~447, 1980.
- 13) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining, *J. cell. Biol.*, 66: 188~193, 1975.
- 14) 杉下 匡: アメリカにおける Flow-system の実情, *臨床婦産*, 31: 565~578, 1977.
- 15) 杉下 匡, 久保田浩一, 天神美夫, 坪井 透, 佐々木 寛, 岩田正晴, 細川 勉: 子宮頸部の境界病変に対する flow-cytometry による核 DNA 分析の研究, *日産婦東京会報*, 28: 25~30, 1979.
- 16) Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Denaturation of deoxyribonucleic acid in situ, Effect of formaldehyde, *J. Histochem. Cytochem.*, 23: 431~438, 1975.
- 17) Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Cytofluorometric studies on conformation of nucleic acid in situ, I Restriction of acridine orange binding by chromatin proteins, *J. Histochem. Cytochem.*, 24: 40~48, 1976.
- 18) Traganos, F., Darzynkiewicz, T., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using Acridine Orange in a flow cytofluorometric system, *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 46~56, 1977.