原 著

化学療法の効果判定における腹水細胞診 および Flow Cytometry の応用

佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科¹⁾

新潟大学医学部産婦人科²⁾

杉田 道夫¹⁾ 室谷 哲弥¹⁾ 杉下 匡¹⁾ 天神 美夫¹⁾
岡田 久²⁾ 田中 耕平²⁾ 本間 滋²⁾

癌性腹膜炎を合併した卵巣および卵管癌につき, cisplatin, adriamycin, endoxan, 5-FU, による多剤併用療法を施行し, その治療前後の腹水細胞診および FCM による核 DNA パターンの変化と臨床効果を比較検討し, 次の結論を得た.

- 1) 治療効果の弱い症例では, DNA パターン・腹水細胞診とも変化はなかった.
- 2) 腹水細胞診では, 治療効果として, 核の腫大, 細胞質内空胞, 多核化現象, 核破壊などの所見が認められた.
- 3) 核 DNA パターンでは, 治療効果として, 4C 以上の高倍体の増加, 4C ピークの低下が認められた.
- 4) 2C 部分 (G_0 or G_1) は, 今回の化学療法ではほとんど感受性がないと考えられる.
- 5) 今後さらに化学療法の効果判定および follow-up の1法として, 腹水細胞診・FCM が応用されよう.

Key words : Peritonitis carcinomatosa—Cytology—Flow cytometry—Chemotherapy
—Cell kinetics

は じ め に

1976年, cis-diamminedichloroplatinum (II) (以下 cisplatin と略す) は, Wiltshaw and Kroner²³⁾ により初めて卵巣癌に使用されて以来, 卵巣癌化学療法剤の1

Application of flow cytometry and cytology to the evaluation of chemotherapeutic agents

Michio SUGITA¹⁾, M.D., Tetsuya MUROYA¹⁾, M.D., Tadaki SUGISHITA¹⁾, M.D., Yoshio TENJIN¹⁾, M.D., F.I.A.C., Hisashi OKATA²⁾, M.D., Kohei TANAKA²⁾, M.D., Shigeru HONMA²⁾, M.D.

¹⁾ Dept. of Gynecology, Sasaki Institute Kyoundo Hospital

²⁾ Dept. of OBGYN, Niigata University, School of Medicine

論文別刷請求先 ㊟101 東京都千代田区神田駿河台2の2 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科

昭和57年9月13日受付

つとして定着しつつある.

cisplatin を含めて, 化学療法の効果判定および予後推定は必ずしも容易ではない. しかし, 癌性腹膜炎を合併した症例については, 腹水細胞を採取することは比較的容易であり, 癌細胞に対する直接効果を検討することより, 治療効果の推定が可能となる.

今回, わたくしどもは, 癌性腹膜炎を合併した3症例に対して, cisplatin を中心とした多剤併用療法を施行し, その腹水細胞の観察とそれに基づく Flow Cytometry (以下 FCM と略す) による核 DNA 分析の成績から, 治療効果および予後判定の可能性につき検討し, 良好な成績を得た.

I. 対象および方法

1) 対象および治療方法

対象は癌性腹膜炎を合併した卵巣癌2例, 原発性卵管癌1例で, 全例ともすでに手術, 放射線, および化学療法を受けている.

症例の現病歴, 治療経過は以下のとおりである.

症例 1

患者: C. S., 45 y/o, female.

診断: ovarian carcinoma stage Ia (papillary cystadenocarcinoma) → peritonitis carcinomatosa

現病歴: 昭和55年, 健康診断で下腹部 tumor を指摘され当科受診, ovarian cyst の診断で ope 施行 (6/15/'79) patho で ova. ca. と判明 chemotherapy 後退院 (8/10/'79).

10月27日, peritonitis carcinomatosa となり再入院. radiation therapy, chemotherapy 施行中.

治療経過: ① operation; right salpingo-oophorectomy (6/15/'79) + left oophorectomy

② radiation therapy (11/1~12/23/'80)

③ chemotherapy

a) C.Q. 8 mg
5FU 250 mg × 7 } 5 weeks (6/25~7/29/'79)
b) EDX 200 mg/day
5FU dry syrup 4.0 g/day } (1/6~1/30/'80)
c) Cis-platinum 80 mg
ADM 65 mg
5-FU 500 mg × 5 days } 4 courses (2/21, 3/23, 4/20, 6/1/'81)
EDX 500 mg
9/17/'81 死亡.

症例 2

患者: S.T., 60 y/o, female.

診断: ovarian carcinoma stage Ia → (mucinous cystadenocarcinoma) peritonitis carcinomatosa

現病歴: 昭和55年8月6日, 某病院にて ovarian carcinoma の疑いにて手術. 術後 FAMT 療法後退院. 昭和56年2月頃, peritonitis carcinomatosa となり当科入院.

治療経過: ① operation; abd. simple hysterectomy (8/6/'80) bilat. salpingo-oophorectomy

② FAMT (FAM)

③ EDX (p.o.) Sep/'80~Mar/'81

④ Cis-platinum 80 mg
ADM 65 mg
5-FU 500 mg × 5 days } 3 courses (3/23, 4/15, 5/25/'81)
EDX 500 mg

10/3/'81 死亡.

症例 3

患者: M.O., 36 y/o, female.

診断: adenocarcinoma of the fallopian tube → peritonitis carcinomatosa

現病歴: 昭和55年4月, myoma ut. の診断で ope 施行. ope 時に認められた ut. rectum および adnexa の米粒大の腫瘍は adenocarcinoma と判明し, 術後 radiation therapy および chemotherapy 施行後退院し, 経過を観察していた.

昭和56年3月20日, peritonitis carcinomatosa となり再入院となる.

治療経過: ① operation (4/4/'80) abd. simple hysterectomy with bilat. salpingectomy

② radiation therapy (4/15/'80~5/30) tele. cobalt 1,500 × 34 = 5,100 rad

③ chemotherapy (6/6, 7/4/'80) 5FU 3,000 mg, EDX 1,600 mg, Act. D 2.5 mg

④ 再入院後 (3/31/'81, 4/28/'81, 6/2/'81)

Cis-platinum 70 mg
EDX 525 mg
ADM 60 mg
5FU 525 × 5 days } 3 courses

2nd course 後 ascites は激減, 消失した. 6/26/'81 退院.

外来にて follow-up していたが, 再び腹水を認め, 11/11/'81 再入院.

cisplatin 64 mg
EDX 500 mg
ADM 50 mg
5-FU 500 mg × 5 days } 4 courses (11/24/'81, 12/23/'81, 1/31/'82, 3/21/'82)

腹水は初回治療後減少し, 3回目治療開始時にはほとんど認められなかった. 4クルールの治療を行い, 4/17/'82 退院した.

治療方式は, 癌研・化学療法センター方式 (小川一誠) である cisplatin, 5-FU, adriamycin, および endoxan の多剤併用療用を用いた (表1).

2) 検体処理

化学療法の前後で腹水を採取し (治療後は5~7日後に採取した) 一部は Papanicolaou 染色後, 細胞形態を観察した. また, 残りは高速ブレンダー (21,000 r.p.m) にて10~20秒分散させ, 遠沈後0.1% ペプシン溶液 (0.2% Hcl 水溶液, 対タンパク消化力1:10,000) を10 ml 加えて, 37°C 20分間 incubation し, 裸核処理した. 次に, ethidium bromide (10 µg/ml in tris buffer) で20~30分間染色し, 最後に40 µm ナイロンメッシュを

表 1 Combination Chemotherapy for Non-Oat Cell Cancer of Lung, Endometrial Cancer and Ovarian Cancer

Cis-platinum	50 mg/m ² continuous 24 hr infusion day 1
Cyclophosphamide	350 mg/m ² I.V. day 1 q 3 wks
Adriamycin	40 mg/m ² I.V. day 1
5-Fu	350 mg/m ² I.V. days 1~5

Cancer Chemotherapy Center, 1979.

通して Impulse Cytophotometer (以下 ICP と略す) 11 型にて核 DNA ヒストグラムを作製した²⁰⁾.

II. 成績

1. 腹水細胞診上の変化

第1例(図1), 第2例(図2)の治療効果の少なかった症例では, 化学療法の前後での細胞像の変化はほとんどみられず, ロゼット形成, 著明な核小体など adenocarcinoma に典型的な所見が認められた.

一方, 治療効果の認められた第3例(図3~7)では,

図 1 上: 第1例治療前腹水細胞 (Pap., ×400)
下: " 治療後腹水細胞 (Pap., ×400)

図 2 上: 第2例治療前腹水細胞 (Pap., ×400)
下: " 治療後腹水細胞 (Pap., ×800)

図 3 第3例治療前腹水細胞 (Pap., ×400)

化学療法の前後で細胞形態は著しく変化し, 治療前にはほとんど認められなかった細胞質内空胞, 核破壊, 核の腫大, 多核化現象などの所見が認められた.

2. 核 DNA ヒストグラム上的変化

治療効果の少ない第1例(図8), 第2例(図9)では, 化学療法の前後で核 DNA ヒストグラムには, 大きな変化はみられず, 高倍体域が少ない 2C にピークをもつ, 一見正常と思われるヒストグラムを呈した.

図 4 第3例治療後腹水細胞（細胞質内空胞，多核化，Pap., ×400）

図 7 第3例治療後（多核化，核腫大，Pap., ×400）

図 5 第3例治療後（細胞質内空胞，Pap., ×400）

図 6 第3例治療後（多核化，核腫大，Pap., ×400）

一方，第3例（図10）では，治療前後で著しい変化が認められた。治療前では4C部分に第1のピークがあり，2C部分は第2のピークとなっていたが，治療後では第1のピークが2C域へ移動し，4C以上の高倍体部分の増加がみられた。さらに，再入院時での化学療法でも核DNAヒストグラム（図11）は，同様の所見を呈した。

III. 考 案

1) cisplatin

cisplatin は，プラチナ原子を中心に塩素とアンモニアが平面に対して cis 位に相対した錯体で，Rosenberg らにより初めて抗菌作用および抗腫瘍作用が紹介された^{16-18, 22)}。

cisplatin は癌細胞に対して選択的に uptake されるため効果を示す抗癌剤ではなく，primary site は DNA であり，DNA 合成を阻害するものと考えられている¹⁸⁾。Howle ら¹⁰⁾も Ehrlich 腹水癌細胞による実験で，DNA 合成が選択的に阻害されたと述べている。しかし，その詳細なメカニズムは，種々の説があり，いまだ解明されていない。

卵巣癌に使用されたのは，1976年 wiltshaw and Kroner が最初であり²³⁾，以後急速に普及している。cisplatin の有効率は，単独使用では 5～52%⁶⁾ であり，化学療法の既往のない症例に関しては，60% 以上であるとの報告が多い^{2, 6)}。特に腫瘍を縮小させる効果に優れており，わたくしどもも cisplatin により腫瘍が著しく縮小し，second look operation が可能となった症例を経験している。

また，すでにほかの化学療法を行った症例，再発例などの難治症例（薬剤耐性例）に対しても有効であり，cisplatin 単独で 22～25%，adriamycin との combination therapy では 39%，adriamycin, 5-FU, hexamethylmelamine の combination therapy では 52% の有効率を示したと報告されている^{1, 9)}。

副作用に関しては，nausea, vomiting は非常に強く，骨髓抑制作用も出現した。腎毒性は，24 hrs の continuous infusion を使用しているのでほとんど問題はなかつ

図8 上：第1例治療前核DNAヒストグラム
下： " 治療後核DNAヒストグラム

た。

2) 化学療法と腹水細胞診

卵巣および卵管の悪性腫瘍に対する細胞診断として、腔細胞診、捺印細胞診、Douglas 窩穿刺による細胞診などが利用されているが、不利な解剖学的位置のために、いまだ子宮頸癌のごとく広く普及しているとはいえない。

癌性腹膜炎を合併した症例に対する腹水細胞診では、比較的細胞が得やすく、組織型および原発巣の推定はも

ろん、化学療法の癌細胞に対する直接的効果と経時的に観察することも可能であり、その意義はきわめて大きいと考える。

化学療法による子宮頸部正常扁平上皮の形態学的変化に関して、(1) cell enlargement, (2) nuclear enlargement, (3) hyperchromasia, (4) coarse granulation of chromatin, (5) variation in nuclear size and shape, (6) cytoplasmic vacuolization (koilocytotic atypia), (7) menopausal atrophyなどの所見が報告されている¹¹⁾。

図 9 上: 第 2 例治療前核 DNA ヒストグラム
下: " 治療後核 DNA ヒストグラム

しかし、腹水中の悪性細胞に対する化学療法の直接効果に関して述べた報告は非常に少ない。蜂屋⁵⁾、安田²⁴⁾によれば、5-FU および carboquone (CQ) による治療効果の細胞所見として、(1) 標本背景細胞の減少、(2) 腫瘍細胞数の著しい減少、(3) 細胞質の異染性（特に重染色性）と空胞化、(4) 核のびまん性腫大と核内空胞および核破壊像が認められたと報告している。Harder^{7,8)}は cisplatin は DNA 合成阻害作用はあるが、RNA および protein 合成は正常であるため、形態学変化としては、

giant cell formation が認められると述べている。

わたくしどもの細胞所見では、治療効果の弱い 2 例ではほとんど形態学的変化は認められず、腹水が減少し治療効果の認められた第 3 例では、(1) 核の腫大、(2) 細胞質内空胞、(3) 多核化現象、(4) 核破壊、の 4 つの所見が特徴的であった。安田、Harder らの所見と比較すると一致する所見と異なる所見があるが、これは使用した抗癌剤の違いによるものと考えられる。

わたくしどもは、現在培養細胞を使い cisplatin の形

図 10 上: 第3例治療前核 DNA ヒストグラム
下: " 治療後核 DNA ヒストグラム

態学的変化を経時的に観察している。

3) FCM と化学療法

FCM とは、高速で流れる細胞浮遊液より、光学的・電気的信号を検出し、細胞の性質、構造を解明する学問分野¹³⁾で、わたくしどもは、西ドイツ PHYWE 社の ICP 11 型を使用している。

FCM の応用範囲は非常に広く、Cytology Automation のみならず、細胞生物学、免疫学、血液学、遺伝学などにわたっている^{12,19)}。特に近年、癌細胞の cell

kinetics に応用されるようになってきた^{14,15)}。

FCM は多くの長所を有するにもかかわらず、いくつかの欠点もある。つまり、(1) 細胞形態に関する情報が少ない、(2) single cell suspension である必要性、(3) ヒストグラムを反映する細胞の同定、(1) ヒストグラム解析法の問題などである。今回わたくしどもは、高速プレレダーにて single cell suspension とし、Papanicolaou 染色し、形態観察も行っているので、これらの欠点は解決していると考ええる。また、腹水にはもちろん中皮細胞、リンパ

図 11 上: 第3例再発後, 治療前ヒストグラム
下: " 治療後ヒストグラム

球, 好中球などの細胞も含まれているので, 常に Pap. 標本にて, それらの割合を観察している. 今回の症例ではいずれも腫瘍細胞以外の細胞は少なく, 核 DNA ヒストグラムに大きな影響を与えるものではないと考えられた. ヒストグラム解析法は, 現在, ICP からの出力をデュアルフロピーディスクをもつマイコンに接続し, 正規分布および2次関数近似しているが, 将来は, fluorescence の distribution ではなく, DNA 量の distribution に近似した解析法を用いる予定である.

cisplatin と cell kinetics に関しては, 培養細胞を使って, いくつかの研究報告はあるが, 実際に臨床例に応用した報告はほとんどない.

Drewinko and Gottlieb³⁾ は human lymphoma の培養細胞では, cell cycle の各期においてはほぼ同様の殺細胞効果があったと述べている.

一方, Fraval⁴⁾ は chinese hamster V79-379A の培養細胞では, ほかの phase よりも G_1 phase により感受性

があったと報告している.

高橋ら²¹⁾は Ehrlich 腹水癌に cisplatin を作用させ, FCM により cell cycle に及ぼす影響を検討し, cisplatin 投与初期においてはS期の延長と G_2 期ブロック, また時間経過とともに G_1 期ないしは G_1 ~S 期境界でのブロックを若起すると述べている.

わたくしどもの治療効果の少なかった症例では, ヒストグラムはほとんど変化なく, 治療効果が認められた症例では, 4C 以上の高倍体域が増加するとともに, 4C ピークが 2C 域へ移動した. このヒストグラム上の変化に対する解釈は非常に難しいが, 4C 以上の高倍体域の増加は, 治療効果による腫瘍細胞の死を意味するものと考ええる. すなわち, cell cycle から外れた増殖できない機能相に相当する細胞が大部分を占めていると思われる. また, 2C ピークの部分 (G_0 , G_1) にはほとんど感受性を示さないものとする. これは, 2C 部分が太田¹⁵⁾, 小川¹⁴⁾らの述べているいわゆる G_0 細胞 (dormant cell) がほとんどを占めているのか, あるいは G_1 細胞も cisplatin に感受性を示さないためか, 現在のところ明らかではない.

培養細胞での報告とかなり異なる点もあるが, これは細胞の種類, cisplatin 単独ではないこと, 腹水細胞の治療から採取までの時間の違いによるものとする.

ま と め

以上のごとく, 化学療法の follow-up として腹水細胞診および FCM を応用することにより, 得られる情報は多く, 今後さらに治療効果, cell kinetics, 感受性, 予後判定などに幅広く利用されることと思う.

本論文の要旨は, 第19回日本癌治療学会総会 および 第20回日本臨床細胞学会秋期大会において 発表した. また 本研究の一部は, 厚生省がん研究助成金 (57-12, および 57-25) によるものである.

Summary

Chemotherapy using cisplatin adriamycin, endoxan, and 5-FU in combination was carried out in cases of ovarian cancers and adenocarcinoma of the fallopian tube accompanied by peritonitis carcinomatosa.

A comparative study by cytology and flow cytometry after chemotherapy and examination of the clinical effects was carried out, and we would like to present the findings here.

1) In cases in which the effects of the chemotherapy were slight, there was no significant change in either the DNA pattern or cellular morphology.

2) Changes in cytology as a result of therapy included nuclear enlargement, cytoplasmic vacuolization, polynucleation, and karyorrhexis.

3) Changes in the DNA pattern as a result of therapy included the increase of polyploidy over 4C and the decrease of the 4C peak.

4) 2C region (G_0 or G_1) is thought to be almost insensitive to present chemotherapeutic agents.

5) A follow-up study of the effects of the therapy will be conducted by cytology and flow cytometry.

文 献

- 1) Albert, D.S., et al. : Cisplatin combination chemotherapy for drug-resistant ovarian carcinoma, 393, 401, CISPLATIN, Academic Press, New York, 1980.
- 2) Briscoe, K.E., et al. : cis-Dichlorodiammineplatinum (II) and Adriamycin Treatment of Advanced Ovarian Cancer, Cancer Treatment Reports, 62 : 2027 ~ 2030, 1978.
- 3) Drewinko, B., et al. : Action of cis-dichlorodiammineplatinum (II) at the cellular level, Cancer Chemother. Rep., 59 : 665~673, 1975.
- 4) Fraval, H.N.A., et al. : G_1 phase chinese hamster V79-379A cells are inherently more sensitive to platinum bound to their DNA than mid S phase or asynchronously treated cells, Biochemical Pharmacology, 28 : 1575~1580, 1979.
- 5) 蜂屋祥一・他 : 腹水細胞診について, 産科と婦人科, 46 : 1021~1026, 1979.
- 6) Hall, D.J., et al. : cis-Platinum in gynecologic cancer, Am. J. Obstet. Gynecol., 141 : 299~304, 1981.
- 7) Harder, H.C., et al. : Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein synthesis in mammalian cells in vitro, Int. J. Cancer, 6 : 207~216, 1970.
- 8) Harder, H.C., et al. : Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, 98, Springer-Verlag, Heidelberg, 1974.
- 9) Holland, J.F., et al. : cisplatin therapy of ovarian cancer, 383~391, CISPLATIN, Academic Press, New York, 1980.
- 10) Howle, J.A., et al. : Cis-dichlorodiammineplatinum (II), persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in vitro, Biochem. Pharmacol., 19 : 2757~2762, 1970.
- 11) Koss, L.G. : The effects of alkylating agents on squamous epithelium of the uterine cervix, 522~528, Diagnostic cytology and its histopathologic bases, Philadelphia, 1979.
- 12) Koss, L.G., et al. : Automated Cytology, 1123~1164, Diagnostic cytology and its histopathologic bases, Philadelphia, 1979.
- 13) 野口義夫 : 種々のフロー・サイトメーターの現状についての調査, 電子技術総合研究所彙報, 44 : 160~197, 1980.
- 14) 小川一誠 : 癌の cell kinetics, 臨床医, 3 : 1580~1582, 1977.
- 15) 太田和雄・他 : 細胞回転と制癌, 癌の臨床, 27 : 1499~1506, 1981.
- 16) Prestayko, A.W. : cisplatin : a clinical overview, 1~7, CISPLATIN, Academic Press, New York, 1980.
- 17) Rosenberg, B., et al. : Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode, Nature, 205 : 680~699, 1965.
- 18) Rosenberg, B. : cisplatin : its history and possible mechanisms of action, CISPLATIN, 9~20, Academic Press, New York, 1980.
- 19) 杉下 匡 : アメリカにおける Flow-system の実情, 臨床婦人科産科, 31 : 565~578, 1977.
- 20) 杉田道夫・他 : 核 DNA 分析における新しい組織分散法の応用, 投稿中.
- 21) 高橋克俊・他 : cis-DICHLORODIAMMINEPLATINUM (II) の腫瘍効果 および 細胞周期内進行に及ぼす作用, 癌と化学療法, 9 : 624~631, 1982.
- 22) 塚越 茂 : Cis-diamminedichloroplatinum II のセミノーマ以外の睾丸腫瘍および卵巣癌に対する治療方針, 癌と化学療法, 5 : 871~873, 1978.
- 23) Wiltshaw, E., et al. : Phase II study of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875) in advanced adenocarcinoma of the ovary, Cancer Treat. Rep., 60 : 55~60, 1976.
- 24) 安田 允・他 : 卵巣癌腹水細胞の抗癌剤による形態的変化, 日臨細胞誌, 20 : 268~274, 1981.