原 著

子宮頸部スミアにみられた koilocyte の超微形態像

東北大学医学部産科学婦人科学教室¹⁾, 酒田市立病院産婦人科²⁾及川 直弘¹⁾ 土岐 利彦¹⁾ 田勢 亨¹⁾和田 裕一¹⁾ 矢嶋 聡¹⁾ 佐藤 信二²⁾

子宮頸部スミア中にみられた, いわゆる koilocyte に関して, HPV 抗原の存在を免疫組織学的に検討し, また, その超微形態像を, 走査電顕と透過電顕によって観察し, 以下の結果を得た.

- 1) 一部の koilocyte の核内に, PAP 法によって HPV 抗原の存在が証明された.
- 2) 走査電顕像では, 一部の koilocyte は細胞の中心部が陥凹した, 特異な 3 次元構造を呈していた.
- 3) 透過電顕像では, koilocyte の核周囲に, 電顕的に無構造なスペースが存在し, 一部の koilocyte では, human papillomavirus と思われるウイルス様粒子が, 主として核内に認められた.

Key words: Cervical smear—Electron microscopy—Koilocyte—Human papillomavirus

察したので報告する.

I. はじめに

Koilocytotic atypia は, 1956 年に Koss と Durfee⁵⁾ によって提唱され, その後, Meisels らによって, human papillomavirus (HPV) 感染の際に出現することが明らかとなった^{7,8)}. Koilocytotic atypia は, 細胞学的にも, 組織学的にも, 核異型を伴った核周囲 halo が特徴的所見である. 特に細胞診上では, balloon cell または, 単に koilocyte と呼ばれる, 非常に特異な細胞の出現が, HPV 感染に特徴的といわれている.

今回われわれは, 頸部スミア中にみられた koilocyte の超微形態像を, 走査電顕, 透過電顕の双方を用いて観

II. 対象および方法

組織学的にも koilocytotic atypia を呈した 5 症例か

表 1 走査電顕手技

1) koilocyte の位置をスライドガラスの裏面にマーク
2) 低倍率で目的細胞を中心に写真撮影
3) カバークラスを除去
4) 風 乾
5) 金蒸着
6) 観察 (日立 S-450)

表 2 透過電顕手技

1) koilocyte の位置をスライドガラスの裏面にマーク
2) 低倍率で目的細胞を中心に写真撮影
3) カバークラスを除去
4) 再水化
5) 1% 四酸化オスミウムで室温 30 分後固定
6) 脱 水
7) ゼラチンカプセルで樹脂包埋
8) 薄切 (Dupont MT-5000)
9) マウンティング (Formvar-coated monopore grids)
10) 二重染色 (酢酸ウラン, クエン酸鉛)
11) 観察 (日立 H-700)

Ultrastructural observation of the koilocytes noted on the uterine cervical smear

Naohiro OIKAWA¹⁾, M.D., Toshihiko TOKI¹⁾, M.D., Toru TASE¹⁾, M.D., Yuichi WADA¹⁾, M.D., Akira YAJIMA¹⁾, M.D., M.I.A.C., Shinji SATOH²⁾, M.D.

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Sakata City Hospital

論文別刷請求先 ☎980 仙台市星陵町 1 の 1 東北大学医学部 産婦人科 土岐利彦

昭和 61 年 6 月 18 日受付

昭和 61 年 9 月 19 日受理

ら、多数の koilocyte を含む通常の頸部スミアの、パパニコロ染色標本を1症例につき2~4枚選び、対象とした。

電顕観察に先立って、パパニコロ脱色後の標本に、

PAP 法を用いて、HPV 抗原の免疫染色を行った。

表1に走査電顕の手技を、表2に透過電顕の手技を示した。

図1 Koilocyte のパパニコロ染色 (×320)

図2 Koilocyte の HPV 抗原染色 (PAP 法, ×320).
核内陽性像を示す

図3 Koilocyte の走査電顕像 (×1,600, Bar=5 μm)

III. 結 果

Koilocyte は、パパニコロ染色では、軽度の核異型を伴い、特徴的な核周囲 halo を呈する (図1)。Halo の外側の細胞質は比較的厚く、cyanophilia や eosinophilia を呈し、halo との境界は一般に clear である。核はやや腫大し、軽度に hyperchromatic で、しばしば2核・多核を呈する。

PAP 法による HPV 抗原の染色では、一部の koilocyte の核内に陽性所見を認めた (図2) が、多くの koilocyte では HPV 抗原は陰性であった。

Koilocyte の走査電顕像を、図3、4に示した。一部の koilocyte は、細胞の中心部が陥凹した独特の3次元構造をしており、ときに、核の存在が認められた。これに対して、その他の koilocyte と正常の扁平上皮細胞は、より平坦で単純な構造を示していた。細胞の表面構

造に関しては、保存性のよい、一部の koilocyte では、microridge の存在が確認された。

Koilocyte の透過電顕像を、図5、6に示した。図5では、koilocyte の核は2核を呈し、変性したクロマチンが集塊をなしており、その周囲には、電顕的に無構造な部分が広く存在した。この無構造な部分の外側には、多数の tonofilaments が観察された。また、固定不良と、エポン浸透不良により保存性はあまりよくないが、一部の koilocyte では、直径 40~50 nm のウイルス様粒子が主として核内に、一部では核外に、クロマチンの集塊に隣接して、散在性に認められた (図6)。ウイルス様粒子の結晶状配列は認められなかった。また、このようなウイルス様粒子の認められた koilocyte は、ごく少数であった。

図4 Koilocyte の走査電顕像 ($\times 1,800$, Bar=5 μm)

図 5 Koilocyte の透過電顕像 (original magnification $\times 4,800$, Bar = $1.2 \mu\text{m}$).
核周囲は電顕的に無構造である

図 6 Koilocyte の透過電顕像 (original magnification $\times 27,000$, Bar = $0.2 \mu\text{m}$).
矢印に、核内のウイルス様粒子を示す

IV. 考 察

子宮頸癌の病因として、最近は、単純ヘルペスウイルスに代わって、HPV 感染が注目を集めている¹⁵⁾。主として頸部の dysplasia や atypical condyloma に HPV の capsid antigen や^{1,6)}、ウイルス粒子^{1,13)}、ウイルス DNA²⁾ が証明されており、浸潤癌の一部にも、HPV の DNA の存在が明らかにされている³⁾。

以上のようなことから、koilocytotic atypia も、HPV 感染に特徴的な所見として、再び脚光を浴びるようになってきた。HPV 感染の際に出現する細胞としては、先に述べた koilocyte がよく知られているが、その超微形態像については、いくつかの報告がある。

Recher¹²⁾ は、走査電顕像で、koilocyte は、中心部の陥凹した特徴的な3次元構造を呈すると報告している。われわれの観察では、このような特異な構造を呈する koilocyte は比較的小数であり、その他の koilocyte は、正常の扁平上皮細胞と同様の、より扁平で単純な構造を呈していた。したがって、このような特異な3次元構造は、標本処理過程で生じた人工的産物の可能性も考えられた。

Koilocyte の透過電顕による観察は、いくつかの報告があり、核周囲の無構造性と、核内ウイルス粒子の存在が指摘されている^{4,9)}。われわれの観察でも、ほぼ同様の所見が得られたが、ウイルス様粒子の認められた koilocyte は、ごく少数であった。

核周囲の、電顕的に無構造な部分は、koilocyte の perinuclear halo に相当すると考えられる。ただ、このような核周囲の細胞質は、細胞診標本では無構造に認められるが、電顕用に処理した組織標本の koilocytotic cell では、ribosome が疎に認められると指摘されている¹⁰⁾。したがって、koilocyte の perinuclear halo の部分は、細胞内小器官が全く存在しないのではなく、細胞診標本の処理過程でこれらが変性消失したと考えられる。

ウイルス様粒子や、HPV 抗原が、一部の koilocyte の核内にしか認められないという事実は、組織標本の場合も含めて、今までの報告でも指摘されている^{1,4,6,9)}。この結果の違いには、固定状態の差などの technical なものも考慮に入れなければならないが、より根本的な原因が考えられる。電顕によるウイルス粒子の観察は、HPV の mature virion の証明であり、免疫組織化学的手法は、capsid antigen の証明である¹¹⁾。両法とも、mature な HPV は検出可能であるが、virus が free DNA で存在す

るような場合は、これらの手法では HPV の検出は不可能である。つまり、電顕や、免疫組織化学によって HPV が検出されない koilocyte には、HPV が、ウイルスとして mature の状態ではなく、free DNA のような形で存在していると考えられる。このような場合は、in situ hybridization の手法を用いれば HPV の DNA が証明され、さらに、HPV の subtype も同定できる¹⁴⁾。しかし、この方法は現在あまり一般的ではなく、この問題に関しては、今後、より詳細な検討が必要と思われる。また、一部のウイルス粒子が、核外に観察されたことに関しては、細胞の保存性から考えると、標本処理過程に生じた、人工的産物としたほうが妥当のようである⁹⁾。

以上述べてきたような koilocyte の特異な構造の原因は、HPV 感染による、一種の cytopathic effect であると思われる。しかし、本研究では、通常のパパニコロ染色標本を再処理した検体を用いたため、電顕観察にも支障が多く、今後、よりよい状態での koilocyte の超微形態に関して、研究を進めていくつもりである。

稿を終えるにあたり、ご協力をいただいた当教室の、永沼孝子、宮下則子の両女史に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第27回日本臨床細胞学会総会において発表した。

Summary

The presence of HPV antigen on koilocytes noted on uterine cervical smears was studied according to the immunoperoxidase method, and their ultrastructure was observed by both scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

The results obtained were as follows :

1) The presence of HPV antigen in nucleus was confirmed in a few koilocytes by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) method.

2) SEM film revealed some koilocytes with specific three-dimensional structure in the depressed center of the cell body.

3) TEM film showed an electron microscopically unformed portion without cytoplasmic organelle around the nuclei of koilocytes. Further, virus particles thought to be HPV were noted in the nuclei of a few koilocytes.

文 献

- 1) Ferenczy, A., et al. : Human papillomavirus (HPV) in

- condylomatous lesions of cervix, *Am. J. Surg. Pathol.*, 5 : 661~670, 1981.
- 2) Gissmann, L., et al. : Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA, *Int. J. Cancer*, 29 : 143~146, 1982.
 - 3) Gissmann, L., et al. : Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 560~563, 1983.
 - 4) Hills, E. and Laverty, C.R. : Electron microscopic detection of papillomavirus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear, *Acta Cytol.*, 23 : 53~56, 1979.
 - 5) Koss, L.G. and Durfee, G.R. : Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix : Cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia, *Ann. NY Acad. Sci.*, 63 : 1245~1261, 1956.
 - 6) Kurman, R.J., et al. : Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 140 : 931~935, 1981.
 - 7) Meisels, A. and Fortin, R. : Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns, *Acta Cytol.*, 20 : 505~509, 1976.
 - 8) Meisels, A., et al. : Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study, *Acta Cytol.*, 21 : 379~390, 1977.
 - 9) Morin, C. and Meisels, A. : Human papilloma virus infection of the uterine cervix, *Acta Cytol.*, 24 : 82~84, 1980.
 - 10) Okagaki, T., et al. : Koilocytosis in dysplastic and reactive cervical squamous epithelium ; An ultrastructural study, *Acta Cytol.*, 22 : 95~98, 1978.
 - 11) Pfister, H. : Biology and biochemistry of papillomaviruses, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 99 : 111~181, 1984.
 - 12) Recher, L. : Scanning electron microscopy of koilocytotic atypia, *Acta Cytol.*, 28 : 516~517, 1984.
 - 13) Reid, R., et al. : Noncondylomatous cervical wart virus infection, *Obstet. Gynecol.*, 55 : 476~483, 1980.
 - 14) Wagner, D., et al. : Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization, *Obstet. Gynecol.*, 64 : 767~772, 1984.
 - 15) Zur Hausen, H. : Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 78 : 1~30, 1977.
-