原 著

子宮内膜細胞診における Ag-NOR の診断的価値

——正常子宮増殖期内膜と高分化型腺癌の比較——

国立横浜病院産婦人科¹⁾, 東京医科大学産科婦人科学教室²⁾小坂 順治¹⁾ 永田 順子¹⁾ 岡部 一裕²⁾ 高山 雅臣²⁾

核小体形成領域 (nucleolar organizer regions : NOR) は rRNA をコードする DNA ループで、これをとりまく非ヒストン蛋白質は好銀性で (Ag-NOR), 銀染色により容易に染色できる。Ag-NOR は細胞の増殖性と関連するため Ag-NOR の数がヒトの腫瘍の診断や予後判定のうえで有用であるといわれ、ヒトの子宮内膜においても内膜増殖症では異型性が増すほど Ag-NOR も増え、腺癌ではさらに増えるとの報告がある。そこで、エンドサイトまたはウテロブラシを用いた子宮内膜擦過細胞診標本における Ag-NOR を観察し、細胞診断学的に有用であるかどうかを検討した。対象は正常増殖期子宮内膜 20 例と高分化型腺癌 9 例で、エンドサイトまたはウテロブラシで内膜細胞を採取し、銀染色を行い 20~30 個の細胞の核内の Ag-NOR の数をカウントした。正常内膜では Ag-NOR は 1~6 個、平均 2.68 で、高分化型腺癌では 2~7 個、平均 4.78 であり高分化型腺癌では有意に Ag-NOR の増加が認められた。高分化型腺癌では核異型が軽度で腺癌としての診断が困難な症例もあり、Ag-NOR は安価で簡単な操作で染色できることから、細胞診における補助的診断に有用であると考えられた。

Key words : Endometrial carcinoma——Endometrial cell samples——Ag-NOR——Cytology

I. 緒 言

核小体形成領域 (nucleolar organizer regions : NOR) はヒトでは第 13, 14, 15, 21, 22 染色体にみられる DNA ループで、rRNA をコードしており、

Ag-NOR counts in endometrial cell samples : comparison between normal endometrium and well-differentiated adenocarcinomas

Junji KOSAKA¹⁾, Junko NAGATA¹⁾, Kazuhiro OKABE²⁾, Masaomi TAKAYAMA²⁾, M.D.

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, National Yokohama Hospital

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College

論文別刷請求先: 〒252 横浜市戸塚区原宿 252 国立横浜病院産婦人科 小坂順治

平成 5 年 2 月 23 日受付

平成 5 年 6 月 18 日受理

これを取り巻く非ヒストン蛋白質は好銀性で、銀染色により簡単に染色ができることが知られている。これを Ag-NOR とよぶが、この Ag-NOR は細胞の増殖性と関連するため、Ag-NOR の数がヒトの腫瘍の診断や予後判定のうえで有用であるといわれる。ヒトの子宮内膜においても月経周期によって Ag-NOR は変化し、内膜増殖症では異型性が増すほど Ag-NOR の個数は増え、腺癌ではさらに増えるとの報告¹⁾がある。そこで、エンドサイトまたはウテロブラシを用いた子宮内膜擦過細胞診標本における Ag-NOR を観察し、細胞診断学的に Ag-NOR が有用であるかどうかを検討した。

II. 対象と方法

対象は高分化型腺癌と組織学的に診断されたものの

術前の症例 9 例 (表 1) で、術後の診断は I a 期が 7 例, I b 期が 2 例である。年齢は 48 歳から 56 歳であった。case 2, 5, 6 は閉経後の不正出血が主訴であり case 3, 4, 7, 9 は月経以外の不正出血が主訴で case 8 は過多月経を主訴としていた。対照として、25 歳から 40 歳までの月経周期が 25~35 日である健康な女性の増殖期 (月経周期第 9 日~第 12 日) 子宮内膜 20 例から得た内膜細胞診標本を用いた。方法は、エンドサイトまたはウテロブラシにより子宮内膜細胞を採取し、スライドグラスに塗抹して 95% エタノールで固定後、パパニコロー染色を行い、内膜細胞にマー

表 1 高分化型腺癌

case no.	age	stage	clinical symptom
1	48	I a	irregular genital bleeding
2	52	I a	postmenopausal bleeding
3	49	I b	irregular genital bleeding
4	48	I a	irregular genital bleeding
5	54	I a	postmenopausal bleeding
6	56	I a	postmenopausal bleeding
7	49	I b	irregular genital bleeding
8	55	I a	hypermenorrhea
9	50	I a	irregular genital bleeding

写真 1 正常増殖期内膜細胞。a: パパニコロー染色 (×200), b: Ag-NOR 染色 (×1000)

クし 10% 塩酸アルコールで脱色した標本を表 2 に示す方法で銀染色を行い、スライドグラスを 1000 倍で検鏡し 20 個から 30 個の細胞の核内のドット数をカウントし平均個数を比較した。

III. 結 果

子宮内膜細胞の Ag-NOR は写真 1, 2 に示すように核内に黒色に点状または小円形状に染色される。写真 1 a は正常増殖期内膜のパパニコロー染色で写真 1 b は Ag-NOR 染色である。写真 2 a は高分化型腺癌細胞のパパニコロー染色、2 b が Ag-NOR 染色である。個々の症例における Ag-NOR の個数の平均をま

表 2

- 1 蒸留水で水和
- 2 2% グラチン加 1% 蟻酸水溶液と 50% 硝酸銀水溶液を 1:2 の割合で混合した染色液に室温で 30 分間浸染
- 3 脱イオン水で 3 回洗浄
- 4 Mayer ヘマトキシリンで核染色 2 分
- 5 水洗しアルコール系で脱水後封入
- 6 1000 倍で検鏡し 20 個から 30 個の細胞の核内のドット数をカウント

写真 2 高分化型腺癌細胞。a: パパニコロー染色 (×1000), b: Ag-NOR 染色 (×1000)

とめたものが表3である。正常性周期で細胞の増殖が盛んな増殖期における子宮内膜ではAg-NORは1~6個, 平均2.68で, 7個以上のAg-NOR数の核は認められなかった。一方高分化型腺癌ではAg-NORは2~7個, 平均4.78で20%の核に7個以上のAg-NORが認められ, 正常子宮内膜細胞に比べ有意($p<0.01$)にAg-NORの増加が認められた。

高分化型腺癌のI a期, I b期のAg-NOR数を比較すると, case 3, case 7のI b期の2症例は平均4.93でI a期の症例に比し例数は少ないが高値を示す傾向がみられた。

以上の成績より高分化型腺癌では正常子宮内膜に比し有意にAg-NOR数の増加が認められ, 癌化の指標を示唆する所見と考えられる。

IV. 考 察

腫瘍の増殖能を知することは, 予後の推定や治療法の選択, 悪性度の診断のために重要であり, 増殖能の指標としてKi-67やPCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) そしてAg-NORなどが知られている。澤田ら²⁾は子宮体部上皮性腫瘍ならびに関連病変において内膜増殖症と腺癌におけるPCNAの標識率を比較し, 内膜増殖症ではPCNA標識率は0%であったのに対し腺癌では24%であると述べ体部悪性腫瘍においてはPCNAが悪性度の指標になることを示唆している。Ag-NORについては, 腫瘍の悪性変化に伴いAg-NORが増加し診断的価値もありうることは, J. Crocker³⁾により, non-Hodgkin's disease, skin neoplasms, mesothelioma などについて報告されている。婦人科の腫瘍においても腫瘍の悪性度によりAg-NORが変化するという報告は多くみられる。M. Eganら⁴⁾は, CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasm) においてCIN 3のAg-NORがCIN 1あるいはCIN 2に比べ増加すると報告しており, J.F. Darneら⁵⁾は, 子宮頸部のinvasive adenocarcinomaにおけるAg-NORがAIS (adenocarcinoma *in situ*) に比べ増加すると述べている。また, E. Chalasら⁶⁾は, endometriosis, atypical endometriosis および clear cell carcinoma と endometrioid carcinoma におけるAg-NORを検討し, 悪性化に伴いAg-NORの数が増加することを指摘している。このようなことからある組織についてAg-NORの数をカウントすることにより, その悪性度を推測することがある程度可能であ

表 3

正常子宮内膜		高分化型腺癌	
case no.	average	case no.	average
1	2.68	1	4.85
2	2.82	2	4.83
3	3.05	3	4.93
4	3.15	4	4.43
5	2.52	5	4.89
6	2.48	6	4.43
7	2.72	7	4.93
8	2.40	8	4.98
9	2.40	9	4.78
10	3.25		
11	3.20		
12	2.50		
13	2.40		
14	2.40		
15	2.85		
16	3.00		
17	3.05		
18	2.24		
19	2.20		
20	2.35		

正常子宮内膜: mean: 2.68, SD: 0.299

高分化型腺癌: mean: 4.78, SD: 0.209

ると考えられ, Ag-NORにより悪性度の診断もできるのではないかと考えられる。

子宮内膜組織におけるAg-NORについて利部ら¹⁾は, 老人萎縮内膜, 正常増殖期および分泌期内膜, 子宮内膜増殖症, 子宮内膜癌について比較し, 増殖内膜のAg-NORが 2.93 ± 0.83 個であるのに対しG1腺癌では 3.87 ± 1.34 個であり, 増殖症においても異型性が増すほどAg-NORが増えると報告している。また, 玉舎⁷⁾も同様に子宮内膜腺におけるAg-NORが月経周期で変動し, 増殖期には増え分泌期には減少すること, 内膜癌では増加し高分化型~中分化型腺癌ではMPA (酢酸メドロキシプロゲステロン) 投与により減少することなどを指摘している。このように, 子宮内膜におけるAg-NORは月経周期によって変化だけでなく, 癌化により増加することが知られている。

近年子宮体癌は増加傾向にあり, 体癌の早期発見のための診断法としての子宮内膜細胞診の役割はますます重要になっている。子宮内膜細胞診における体癌の発見率は蔵本⁸⁾によれば初回の細胞診では約83%であるが, 分化型腺癌(G1, I期)では偽陰性率が約37%と高い。G1腺癌では核異型のたいへん乏しい例

があり、細胞診標本においても核形の不整、核の大小不同、核小体の出現などの癌細胞としての特徴がはっきりしないことがあるため、偽陰性率が高くなると考えられる。この偽陰性率は繰り返し細胞診を行うことにより低めることができるが、一般の検診などで偽陰性となった場合にはその後の follow up に問題を生じる可能性が危惧される。今回のわれわれの研究では内膜細胞診における Ag-NOR が G1 腺癌で有意に増加することが示された。さらに Ag-NOR は Ki-67 や PCNA などと比較して大変安価で、しかも簡単な操作で 40～50 分の間に染色できるため、細胞診における補助的診断に有用であり、特に大量の検体を処理する場合にでも positive か negative かの診断の参考となりうると考えられた。

V. 結 語

エンドサイトまたはウテロブラシを用いて外来における通常の方法で採取した子宮内膜細胞診標本において、G1 腺癌細胞では正常子宮増殖期内膜細胞に比べ、有意に Ag-NOR の増加が認められた。高分化型腺癌では核異型が少なく診断が困難である場合もあり、そのような場合には偽陰性となることがあるが、Ag-NOR は安価で簡単な操作で染色できるため、細胞診における補助的診断に有用であると考えられた。

Summary

Nucleolar organizer regions are loops of DNA, which in humans are found on chromosomes 13, 14, 15, 21, and 22, and code for ribosomal RNA. They are associated with nonhistone nucleoproteins, which can be stained with silver (Ag-NOR). An increased number of Ag-NOR has been observed in many malignancies and Ag-NOR counts are useful for tumor diagnosis. Ag-NOR were counted in two groups of women: those with endometrial well-differentiated adenocarcinomas (n=9) and another group with normal endometrium in the proliferative phase (n=20). The en-

dometrial cell samples were taken with an endocyt or uterobrush. Mean Ag-NOR counts were 4.81 in well-differentiated adenocarcinomas and 2.68 in normal proliferative phase endometrium. The results were analyzed and the number of Ag-NOR per nucleus was significantly higher in the endometrial adenocarcinoma cells than in the normal proliferative phase endometrial cells ($p<0.01$). Ag-NOR counts provide useful information, are inexpensive, can be obtained from endometrial cell samples and may aid in the clinical diagnosis of patients with endometrial well-differentiated adenocarcinomas.

文 献

- 1) 利部輝雄, 佐藤昌之, 井筒俊彦・他: ヒト子宮内膜の核小体形成領域所見, 日産婦誌, 43: 791～792, 1991.
- 2) 澤田益臣・他: 婦人科腫瘍並びに関連病変における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の免疫組織学的検討, 日産婦誌, 44: 181～187, 1992.
- 3) Crocker, J.: Nucleolar organizer regions In Underwood JCE ed. Current Topics in Pathology, 92～149, Springer Verlag, Berlin, 1989.
- 4) Egan, M., Freeth, M. and Crocker, J. et al.: Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervix and the size and number of nucleolar organizer regions, Gynecol. Oncol. 36: 30～33, 1990.
- 5) Darne, J.F., Polacz, S.V. and Sheridan, E. et al.: Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma *in situ* and invasive adenocarcinoma of the cervix, J. Clin. Pathol. 43: 657～660, 1990.
- 6) Chalas, E., Chumas, J. and Barbieri, R.: Nucleolar organizer regions in endometriosis, atypical endometriosis, and clear cell and endometrioid carcinomas, Gynecol. Oncol. 40: 260～263, 1991.
- 7) 玉舎輝彦: 核小体形成領域 (体) の臨床, 産婦治療, 63: 453～459, 1991.
- 8) 蔵本博行: カラーアトラス子宮体癌検診, 11, 医歯薬出版, 東京, 1989.