原 著

末梢流血中腫瘍細胞の研究*

(九州大学医学部第1内科学教室)

(主任:柳 瀬 敏 幸 教授)

(指導:服 部 絢 一 助教授)

谷 本 一 夫**

目 次

1. 緒 言
2. 実験方法および成績
 - 2.1. Dextran 法による流血中有核細胞回収実験
 - 2.2. Dextran 法による腫瘍細胞回収実験
 - 2.2.1. 実験に用いた材料
 - 2.2.2. 生細胞回収実験
 - 2.2.3. 印づけ細胞回収実験
 - 2.2.4. 小 括
 - 2.3. 末梢血に出現した細胞の鑑別
 - 2.3.1. 対 象
 - 2.3.2. 非腫瘍細胞
 - 2.3.3. とくに骨髓巨核球について
 - 2.3.4. 腫瘍細胞
3. 考按ならびに総括
 - 3.1. 腫瘍細胞分離方法としての dextran 法の検討
 - 3.2. 末梢流血中に出現する細胞の検討
4. 結 語

1. 緒 言

流血中の腫瘍細胞については、1934年 Pool および Dunlop³⁴⁾ が40例の癌患者について検索し、17例に癌細胞と考えられる大型の細胞をみたと報じ、ついで1955年 Engell⁷⁾ は流血中の悪性腫瘍細胞に関し詳細な報告を行ない、その後、内外の多くの学者によりこの問題は悪性腫瘍の診断、予後との関係、治療の効果判定などの立場から注目、検討されるようになった。

* A study on tumor cells in the peripheral blood.

** Kazuo Tanimoto

(First Dept. of Inter. Med., Kyushu Univ.)

末梢流血中腫瘍細胞の検出率は、Jackson¹⁴⁾の18例中0%から Pimenta de Mello³⁸⁾の200例中96.5%にいたるまで、発表者により、きわめて大きい差がみられる(Table 1)。その原因としては、(1)検査対象の相違、すなわち腫瘍が限局して転移の認められない比較的早期のものから、全身臓器に転移を示す末期状態にあるものまで、対象に含まれる各病症度の分布の相違、(2)採血部位の相違、(3)検体量の多少、(4)腫瘍細胞分離方法、(5)標本作成法、(6)染色方法、および(7)腫瘍細胞の判定基準の相違などがあげられる。なかでも、Christopherson⁵⁾も指摘しているように、腫瘍細胞分離方法および腫瘍細胞判定基準は、もっとも重要な要素と考えられる。

腫瘍細胞分離方法および標本作成方法として、歴史的なものはさておき、現在も用いられているものには、溶血法^{7,28)}、赤血球沈降促進法^{1,27,43,61)}、血球の比重差利用をする浮遊法⁴⁶⁾、酵素による選択的血球溶解法²²⁾、貪食能を利用した magnet 法¹⁸⁾、filter 法^{8,62)}、ならびに以上を適当に組み合わせた方法^{22,28,29,46)}がある。以上の各方法の優劣を比較するには、大別して2つのアプローチがある。ひとつは、同一検体を対象として、それぞれの方法により得られる腫瘍細胞の検出率を比較すること^{59,60)}であり、他は、既知の数の腫瘍細胞を血液に加えて各方法により得られる標本につき回収腫瘍細胞数を比較すること^{30,37,52,54)}である。前者については、腫瘍細胞判定基準の問題とも関連して優劣を比較するのはきわめてむずかしい。後者については、血液に加える既知数の細胞をあらかじめ染色することにより標識しておくことと標本面での検出に便利である。

最近、Stevenson および von Haam⁵²⁾、Pruitt ら³⁷⁾は加える腫瘍細胞数を実際の癌患者流血中の癌細胞数に近似させるため、micropipette を用いてきわめて少数の腫瘍細胞をとり出して、これを血液に加える方法を発表している。回収腫瘍細胞数の比較では、赤血球沈降促進法よりも溶血法、浮遊法または酵素による血球溶解法が

Table 1. Recovery of tumor cells in the peripheral blood

Investigator	Method of cell concentration	Preparation	No. of cases	Per cent positive
Pool, Dunlop 1934	Acetic acid	Section	40	42.5
Engell 1955	Saponin	Section	14	50.0
Moore, <i>et al.</i> 1957	Fibrinogen	Smear	179	52.0
Roberts, <i>et al.</i> 1958	Fibrinogen	Smear	92	16.3
Uno 1958	Hematocrit	Smear	310	60.3
Seal 1959	Silicone flotation	Filter	86	45.3
Alexander, Spriggs 1960	Dextran	Smear	140*	5.0
Romsdahl, <i>et al.</i> 1960	Streptolysin-O	Filter	36**	70.0
Ono, <i>et al.</i> 1960	Mixed	Mixed	302	1.6
Tazaki, <i>et al.</i> 1960	Fibrinogen	Smear	178	29.2
Kuper 1961	Magnetic	Filter	36	8.0
Jackson 1962	Dextran	Smear	18	0
Nedelkoff, <i>et al.</i> 1962	Saponin	Filter	192	1.0
Pruitt, <i>et al.</i> 1962	Streptolysin-O	Filter	547	30.0
Sakurai, <i>et al.</i> 1962	Fibrinogen	Filter	61	3.0
Scheinin, Koivuniemi 1962	Streptolysin-O	Smear	91	3.3
Stein, <i>et al.</i> 1962	Capillary tube	Smear	20	25.0
Asakawa 1962	Glucose-acacia Dextran	Smear	118	22.9
Maki, <i>et al.</i> 1963	Glucose-acacia	Smear	230	6.9
Pimenta de Mello 1963	Fibrinogen	Smear	200	96.5
Stoffberg 1963	Fibrinogen	Smear	50	4.0
Herbeuval, <i>et al.</i> 1963	Saponin	Smear	240	6.0

* Partially taken from the regional vein.

** Disseminated malignant melanoma.

優れ、標本作成方法では、smear 法よりも filter 法が優れているとされている^{4, 37, 52, 54}。しかし、これらの報告の多くは単に量的面での比較にとどまり、細胞の形態学的変化、ひいては腫瘍細胞判定におよぼす影響を検討するまでにはいたっていない。この点、竹内ら⁵⁴の生細胞および印づけ細胞の混入による回収率の比較実験は、量的のみならず、質的にも各分離方法を比較できる利点がある。以上のように、流血中腫瘍細胞の検出には種々の細胞分離方法が考案され、現在もおお新しい手技の開発が試みられている^{8, 47, 62}。理想的な細胞分離方法としては、細胞の損失が少なく、形態学的変化をきたすことなく、さらに操作が簡単で、しかも廉価であることが望ましいが、いずれの方法も一長一短があり、にわかに優劣はつけがたいと考えられる。実際に、各方法により得られた腫瘍細胞検出率^{1, 2, 7, 11, 14, 18, 21, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 51, 53, 55, 57}を通覧するに、患者の選択、分離方法、標本作成方法または染色法の相違によると思われる検出率の差はみだしえない。ここで、検出率の差は、一にか

かって腫瘍細胞判定基準にあるといわざるをえない。

腫瘍細胞判定基準については、Papanicolaou³²)をはじめ、その後多くの優れた業績がみられる^{9, 17}。流血中腫瘍細胞として、他の部位での剝落腫瘍細胞と根本的にはなら異なるところはない。しかし、流血中に出現する腫瘍細胞数は、他部位での出現細胞数に比してきわめて少なく、かつ細胞分離の過程での細胞の変性もあり、加えて流血中には腫瘍細胞とまぎらわしい未熟血液細胞、細胞や核の大きさで注目される骨髓巨核球、特異な細胞の形態を示す内皮細胞などの出現が知られており^{1, 10, 11, 16, 31, 53}、流血中腫瘍細胞検出に関する従来の報告のうちには、このような細胞が腫瘍細胞と誤認されている可能性を説くものも多い^{1, 16, 31}。腫瘍細胞の正確な同定の目的で、Valaitis および McGrew⁵⁸) は骨髓細胞に Papanicolaou 染色を施して観察し、Herbeuval ら¹²) は immunofluorescence を応用して非癌細胞の詳細な検討を試みている。

以上より、流血中腫瘍細胞の検索にあたっては、細胞

のより正確な同定が最大の問題であることが理解できる。

ここでは細胞の正確な同定のために、できるだけ細胞の変性を避ける目的から、細胞分離法としては赤血球沈降促進法、なかでも操作が簡単で低廉な dextran 法を選び、これによる回収率を検討し、ついで健康人、非悪性腫瘍患者および悪性腫瘍患者の肘静脈血を用いて、腫瘍細胞ならびに、これとまぎらわしい非腫瘍細胞を検索し、とくに骨髓巨核球については、各検査対象群別に出現頻度とともに出現数についても検討を加えた。

2. 実験方法および成績

2.1. Dextran 法による流血中有核細胞回収実験

実験方法：4% dextran (R. K. Laros Co. Lot No. 1257 Mol. Wt. 188,000), 3% dextrose の生理食塩水溶液を作成、その 1.25ml をあらかじめシリコンで処置したガラス管にとり、有核細胞数を算定した抗凝固剤加血液 5ml を加えて最終濃度 0.8%⁵⁶⁾とし、室温下に30分間静置、血漿層のみを注意して採取、計量後よく振とうし、その一部をとり有核細胞数を算定、

$$\frac{\text{血漿量(ml)} \times \text{血漿層の有核細胞数}}{\text{検体量(5 ml)} \times \text{検体有核細胞数}} \times 100(\%)$$
をもって有核細胞回収率とした。

成績：健康人20例および各種疾患患者20例、計40例について検索した。再生不良性貧血で有核細胞数 1,500 と高度の減少をみた 1 例で、回収率 33.2% と低値を示したのを除けば、回収率は 65.7±9.4% となり、末梢有核細胞数の多少、貧血の程度、疾患の種類などにより回収率に有意の差はみられなかった。

2.2. Dextran 法による腫瘍細胞回収実験

2.2.1. 実験に用いた材料 (Fig. 1)

癌性腹膜炎患者の腹水で、有核細胞にとみ、そのほとんどが癌細胞と判定でき、赤血球の混入がきわめて少なく、かつ癌細胞がバラバラに存在して島形成傾向に乏しい症例を得ることができたので、腹水を採取して実験材料とし、以下の実験を行なった。

2.2.2. 生細胞回収実験

実験方法：腹水中有核細胞数を算定し、生理食塩水を用いて、0.1ml中に 1×10^3 、 1×10^4 を含むように調製、それぞれを抗凝固剤加正常人血液 5ml に投入して、血液 1ml 中に癌細胞をそれぞれ 200 個および 2,000 個含むものを作成し、以下 dextran 法により型のごとく標本を作成、回収癌細胞数を算定した (Fig. 2)。

成績 (Table 2)：血液 1ml 中 200 個混入群では、3 回の平均で回収率 12.1±1.5% であり、血液 1ml 中 2,000 個混入群では、3 回の平均で回収率 14.1±3.0% であった。

このような低い回収率をきたした理由として、まず標本作成過程での混入細胞の逸脱、つぎに細胞判定上の困難性が考えられる。とくに塗抹標本では、塗抹の始端、末端付近の細胞は、変性あるいは細胞密度が大であるために、しばしば癌細胞と判定するのが困難であった。これらの理由を明らかにする目的で、つぎの実験を行なった。

2.2.3. 印づけ細胞回収実験

実験方法：腹水沈渣の有核細胞層をとり、これを 2% formalin に浮遊させて 30 分間固定し、1,000r.p.m. で 5

Table 2. Recovery test by the use of seeded specimens and dextran sedimentation-smearing technique

No. of tumor cells per ml of blood	Unstained tumor cells added		Stained tumor cells added		
	Sample no.	Per cent of recovery	Sample no.	Per cent of recovery	
				Well-conditioned field	Total field
200	1.	11.8	7.	16.4	26.9
	2.	10.7	8.	14.5	24.3
	3.	13.8	9.	10.4	15.6
	Mean ± S. D.	12.1±1.5	Mean ± S. D.	13.8±3.1	22.3±5.9
2,000	4.	11.1	10.	13.7	33.9
	5.	17.0	11.	11.8	23.2
	6.	14.3	12.	18.3	40.7
	Mean ± S. D.	14.1±3.0	Mean ± S. D.	14.6±3.3	32.6±8.8

分間遠沈した後、沈渣を0.5% gentiana violet 溶液に浮遊させて10分間染色、遠沈後、生理食塩水を加えて過剰の色素を除き、以下、前項(2.2.2.)の方法と同様にして、正常人血液1 ml 中に、印づけ癌細胞それぞれ200 μ , 2,000 μ を含むものを作成し、以下、dextran 法により処理、塗抹標本を染色することなく検鏡、gentiana violet により紫色に染まった細胞について、塗抹標本で始端、末端部などの染色方法のいかんによっては判定不能となるおそれのある塗抹不良部分を除き、良好標本部分の細胞数を算定するとともに、同一標本での被染総細胞数をも算定した (Fig. 3).

成績 (Table 2) : 良好標本部分のみでの回収率は、200 μ 混入群では3回の平均で $13.8 \pm 3.1\%$ 、2,000 μ 混入群では3回の平均で $14.6 \pm 3.3\%$ を得た。なお、総細胞数の回収率はそれぞれ $22.3 \pm 5.9\%$ および $32.6 \pm 8.8\%$ であった。

2.2.4. 小 括

既知数の腫瘍細胞を血液に混入、dextran 法で処理して回収率を算定したところ、生細胞 200 μ 混入群では、回収率12.1%、2,000 μ 混入群では14.1%の結果を得た。一方、gentiana violet で印づけした細胞を同じ方法で検すると、良好標本部分のみでの回収率は、それぞれ 13.8%および14.6%となり、生細胞による回収率とほぼ一致し、この実験に用いた腫瘍細胞では、腫瘍細胞として判定するのにさほどの困難はなかったものと考えられる。しかし、印づけされた細胞の総回収率でも、それぞれ22.3%および32.6%と低く、操作過程での細胞の逸脱がかなり多いことを示唆した。

2.3. 末梢血に出現した細胞の鑑別

2.3.1. 対 象 (Table 3)

検索の対象は健康人30例、非腫瘍疾患患者38例(うち血液疾患 6 例)、癌患者45例、肉腫患者17例、合計130例

Table 3. Materials

Diagnosis	Number of cases
1. Healthy subjects	30
2. Patients with no known malignant disease	38*
3. Patients with malignant disease	62
Carcinoma	45
Larynx	1
Lung	8
Esophagus	2
Stomach	16
Liver	7
Biliary tract	1
Pancreas	1
Colon	1
Kidney	1
Thyroid gland	1
Breast	2
Ovary	3
Malignant melanoma	1
Sarcoma	17
Lymphosarcoma	2
Chronic lymphatic leukemia	2
Reticulum cell sarcoma	7
Hodgkin's disease	2
Malignant lymphoma	4
Total	130

* Including 6 cases blood dyscrasias such as 1 of primary thrombocytopenic purpura, 3 of hypoplastic anemia and 2 of hemorrhagic thrombocythemia.

Table 4. Incidence of benign cells in the peripheral blood

Diagnosis	No. of cases	Cases with							
		Erythroblasts		Myelocytes		Large mononuclear cells		Mitoses	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Healthy subjects	30	0	0	28	93	28	93	4	13
Patients with no known malignant disease	38	3	8	32	84	34	89	7	18
Patients with malignant disease									
Carcinoma	45	6	13	40	89	42	93	12	27
Sarcoma	17	7	41	16	94	17	100	9	53
Total	130	16	12	116	89	121	93	32	25

である。採血は肘静脈、一部は股動脈より行ない、採血量は5 mlとした。以下、型のごとく dextran 法で処理し、1例につき6ないし10枚の塗抹標本を作成し、主として Giemsa 染色を、一部は Papanicolaou 染色を施して観察した。

2.3.2. 非腫瘍細胞 (Table 4)

赤芽球：健康人では、全例に認めえなかったが、癌の広汎転移群で18%、肉腫群で41%と比較的高率に検出した。

未熟顆粒球 (Fig. 4)：前骨髓球および骨髓球は細胞径が大きいので、観察にあたって注意をひきやすい。健康人群においても、これらを93%に検出した。検出率では各疾患群の間に有意の差を認めなかった。骨髓芽球を少数例において認めたが、これは細胞径において比較的小さく、まず大型細胞を問題にする腫瘍細胞検出には、鑑別の対象になることは少ない。

大型単核細胞 (Fig. 5 および 6)：細胞径 20μ 以上のもので、胞体は強塩基性で、核形は類円形、時として陥凹をみるものもあり、核質は増加し、しばしば大型の核小体を認める。大リンパ球、形質細胞、細網細胞にその類型をみる。この大型単核細胞を健康人群にも93%に検出したほか、各疾患群でもきわめて高率に検出した。とくに肉腫群では多数みられ、肉腫細胞との鑑別が困難であった。

核分裂像 (Fig. 7 および 8)：細胞径は 15μ 以上のものが多く、胞体の色調よりリンパ球、形質細胞および上述の大型単核細胞に属するものと考えられる。健康人でも13%に検出したほか、各疾患群に認め、とくに肉腫群では53%と高率に検出した。

組織球 (Fig. 9～12)：細胞径は 20μ 以上のものを対

象とした。胞体は泡沫状をなし、異物の貪食を認めるものもある。核は偏在して印環細胞をなすものもある。紅斑性狼瘡の1例、肺結核の2例、癌の4例およびホジキン病の1例、計8例で検出した。とくにホジキン病では、全標本で62%を認めた。

組織肥胖細胞：赤褐色に濃染する顆粒が充満することにより認めうる。骨髓穿刺液でみるものに比較して胞体は円形化の傾向がみられる。健康人の1例および癌の2例、計3例で検出した。

内皮細胞 (Fig. 13)：胞体は広く、淡染し、核は楕円形ないし卵円形、核膜は薄い核質に乏しいため明瞭、核構造は網状あるいは微細顆粒状をなし、1コないし数コの小型の核小体を認める。健康人の1例、肺結核の1例、膿胸の1例、癌の3例および肉腫の1例、合計7例で検出した。

その他の大型細胞 (Fig. 14)：出血性血小板血症の1例で、細胞径 60μ に達し、多核からなる細胞を検出したが、これは大きな骨髓巨核球ないし破骨細胞に近いものと考えられる。

2.3.3. とくに骨髓巨核球について

流血中の骨髓巨核球の形態学的特徴 (Fig. 15～18)：大型不整で濃染する核が裸核で、あるいは時として胞体を伴っている。しばしば周囲に多数の血小板をみる。核形は不規則で数コに分葉したり、あるいはまったく無関係に多核をなすものもみられ、核相互間にも大小の差をみ、互いに重なり合うものもみられる。核膜は比較的明瞭、クロマチンは成熟度による相違はあるが、小塊をなし、その周辺にクロマチンが少なく、いわゆる target formation²⁴⁾を認めるものがある。核小体は未熟型を除けば明瞭でない。裸核のものでは一見して塊状、詳しく

Table 5. Comparative study on nuclear size of the megakaryocyte in the bone marrow and the peripheral blood

	Mean value $\pm$ S. D. of 50 nuclei (μ)	Per cent of megakaryocytes with cytoplasm
Bone marrow aspirate		
Smear preparation	34.7 $\pm$ 11.5	88
Concentrated with dextran technique	32.6 $\pm$ 6.1	78
Peripheral blood		
Control	26.8 $\pm$ 5.9	18
Carcinoma	27.0 $\pm$ 7.2	28
Hemorrhagic thrombocythemia	34.9 $\pm$ 10.3	36

は分葉状ないしコイル状²⁴⁾をなし、クロマチンは著明に濃縮している。胞体を有するものでは、好酸性の微細な顆粒あるいは血小板形成を思わせる分野形成をみるものが多い。未熟型では、胞体は好塩基性を呈し、前骨髓巨核球、骨髓巨核芽球をみることもある。とくに出血性血小板血症では、流血中に多数の未熟型骨髓巨核球を認めた。

骨髓穿刺液と流血中での骨髓巨核球の形態学的比較
(Table 5) : 骨髓穿刺液でみる骨髓巨核球に比べて、流血中に出現する骨髓巨核球は裸核が多く、核は老熟し、濃縮したものが多く、このような形態学的相違をきたした原因を知るため、健康人の骨髓穿刺液塗抹標本での骨髓巨核球、同一穿刺液を自家静脈血に混入して dextran 法により型のごとく処理して得た標本での骨髓巨核球、さらに健康人群、癌患者群および出血性血小板血症患者の流血中に出現した骨髓巨核球のそれぞれ50コ

について、胞体の有無および核の長径の測定を行ない比較した。結果は、骨髓穿刺液塗抹標本では、胞体を有するもの88%、核径の平均 $34.7 \pm 11.5 \mu$ 、骨髓穿刺液の dextran 法による処理標本では、胞体を有するもの 78 %、核径平均 $32.6 \pm 6.1 \mu$ で、両者の間に有意の差を認めず、操作過程による形態学的変化は僅微であることを示した。

つぎに、健康人群の流血中の骨髓巨核球では、胞体を有するもの18%、核径平均 $26.8 \pm 5.9 \mu$ で骨髓穿刺液に比較して、裸核の増加、核径の減少がみられた。

健康人群と癌患者群の流血中に出現する骨髓巨核球の比較では、癌患者群で胞体を有するもの28%、核径平均 $27.0 \pm 7.2 \mu$ と、健康人群に比べて、胞体を有するものは多かったが、核径では有意の差をみなかった。

出血性血小板血症では、胞体を有するもの36%と多く、核径平均も $34.9 \pm 10.3 \mu$ と大きかった。

Table 6. Incidence of megakaryocytes in the peripheral blood

Diagnosis	No. of cases	Cases with megakaryocytes		No. of megakaryocytes on total slides	
		No.	%	Mean $\pm$ S. D.	Range
Healthy subjects	30	26	87	6.8 $\pm$ 5.6	0~ 21
Patients with no known malignant disease*	32	28	88	13.6 $\pm$ 22.5	0~124
Patients with malignant disease					
Carcinoma	45	39	87	19.9 $\pm$ 29.9	0~162
Sarcoma	17	14	82	16.6 $\pm$ 23.1	0~ 93

* Excluding blood dyscrasias.

Table 7. Relationship of metastatic spreading to incidence of megakaryocytes in the peripheral blood

	No. of cases	Cases with megakaryocytes		No. of megakaryocytes on total slides	
		No.	%	Mean $\pm$ S. D.	Range
Carcinoma					
Localized	23	21	91	15.0 $\pm$ 22.2	0~83
Disseminated	22	18	82	25.1 $\pm$ 38.0	0~162

Table 8. Relationship of chest X-ray findings to incidence of megakaryocytes in the peripheral blood

	No. of cases	Cases with megakaryocytes		No. of megakaryocytes on total slides	
		No.	%	Mean $\pm$ S. D.	Range
Noncancerous disease					
Lung lesion					
Negative	16	13	81	16.1 $\pm$ 30.7	0~124
Positive	16	15	94	10.8 $\pm$ 13.3	0~33
Carcinoma					
Lung lesion					
Negative	30	26	87	10.6 $\pm$ 23.4	0~56
Positive	15	13	87	38.6 $\pm$ 35.8	0~162

流血中骨髓巨核球の疾患別検出成績 (Table 6) : 健康人群においても87%に認めた。血液疾患を除く非腫瘍疾患群で88%, 癌患者群で87%, 肉腫患者群で82%に検出し, 各群の間に有意の差を認めなかった。

しかし各例ごとに検出した骨髓巨核球数を各群別に比較すると, 健康人群では21を最高に, 平均6.8 $\pm$ 5.6, 血液疾患を除く非腫瘍疾患群では, リューマチ様関節炎で124を検出したのを最高に, 平均13.6 $\pm$ 22.5, 癌患者群では, 162を最高に, 平均19.9 $\pm$ 29.9, 肉腫患者群では, 93を最高に, 平均16.6 $\pm$ 23.1を検出した。血液疾患では, 出血性血小板血症の2例でそれぞれ230および390, 特発性血小板減少性紫斑病では43, 再生不良性貧血の3例では, 2例でみだしえず, 1例では1を検出した。以上, 健康人群に比較して, 各疾患群では有意差 ($P<0.01$) をもって増加を認めた。

流血中骨髓巨核球と癌転移との関係 (Table 7) : 癌患者群を限局群23例と遠隔転移群22例に分類して流血中骨髓巨核球を検討すると, 検出率では, 限局群で91%, 遠隔転移群では82%と予想に反する結果を得たが, 骨髓巨核球数は, それぞれ平均15.0 $\pm$ 22.2と, 25.1 $\pm$ 38.0

で, 遠隔転移群に多い結果を得た。

流血中骨髓巨核球と肺陰影との関係 (Table 8) : 胸部X線写真上, 肺異常陰影の有無により検討した。非腫瘍疾患群では, 肺異常陰影の存在と骨髓巨核球の検出率, 出現数との間に関連は認められなかった。癌患者群では, X線写真上無所見の群30例と有所見の群15例に分類して検討すると, 骨髓巨核球の検出率では両群の間に差をみだしえなかったが, 骨髓巨核球数は無所見群で平均10.6 $\pm$ 23.4, 有所見群で38.6 $\pm$ 35.8と, 前項の転移の有無による分類に比較して, さらに判然とした差がみられた。

2.3.4. 腫瘍細胞 (Table 9)

健康人群30例および非腫瘍疾患群38例では, 全例末梢流血中に腫瘍細胞を認めなかった。しかし癌患者群45例では3例 (6.7%) に腫瘍細胞を確認した。これはいずれも遠隔転移を伴う進展癌患者で, 遠隔転移群だけに限れば検出率は13.6%となる。以下, 末梢血中に腫瘍細胞を認めた3例について概要を述べる。

第1例 : 48歳, 男子

Table 9. Incidence of tumor cells in the peripheral blood

Diagnosis	No. of cases	Positive	
		No.	%
Healthy subjects	30	0	0
Patients with no known malignant disease	38	0	0
Patients with malignant disease			
Carcinoma			
Localized	23	0	0
Disseminated	22	3	13.6
Stomach	12	2	
Breast	2	1	
Other	8	0	
Total	45	3	6.7
Sarcoma			
Lymphosarcoma	2	1*	
Chronic lymphatic leukemia	2	2*	
Reticulum cell sarcoma	7	2**	
Hodgkin's disease	2	0	
Malignant lymphoma	4	1	
Total	17	6	35.3

* Leukemic case.

** Including one leukemic case.

昭和35年, 左乳癌で手術, 昭和38年3月より左胸痛, 全身倦怠感あり, 同年5月九州厚生年金病院に入院, 胸部X線写真で両側肺野に転移性腫瘍陰影を認め, 喀痰細胞診でも腫瘍細胞を認めた. 肘静脈血より腫瘍細胞 (Fig. 19) を検出後, 約3カ月で死亡. 腫瘍細胞は Giemsa 染色で細胞径 30μ , 類円形, 胞体は好塩基性で不透明感が強く, 一部には空胞形成を思わす部分もみられる. 核は2コで互いに偏在し, 核膜は明瞭, 核構造は微細顆粒状, それぞれの核の中央に近く, 大型でほぼ円形の核小体をみる. 組織球との鑑別は, 胞体の不透明感, 核の性状ならびに核小体の大型化により可能である. そのほか本例では大型の核分裂像がみられ, 細胞の大きさ, 胞体の色調などより, 腫瘍細胞由来と考えた (Fig. 20).

第2例: 62歳, 男子

昭和38年12月頃から腹部膨満感があり, 昭和39年1月九大第1内科に入院. 胃X線所見で陰影欠損を, 腹水細胞診で腫瘍細胞を認め, 胃癌兼癌性腹膜炎と診断, 肘静脈血より腫瘍細胞 (Fig. 21) を検出後, 約4カ月で死亡. 剖検により噴門部癌, 癌性腹膜炎, 病理組織学的には単純癌と診断された. 腫瘍細胞は, Giemsa 染色で細胞径 20μ , 胞体は全般的に好塩基性で, 一部に紅色調部分

もみられる. 核は細胞のほぼ中央に位置し, 核縁は平滑, 核質にとみ, 1コの大型で明瞭な核小体をみる. そのほか, 類似の細胞を3コ認めえた. いずれも細胞径は比較的小さいが, 胞体の色調の複雑さ, 大型で明瞭な核小体により特徴づけられる.

第3例: 35歳, 女子

昭和38年胃癌の手術を受けた. 昭和40年1月左頸部腫瘍に気づき, 九州厚生年金病院に入院. 胃癌のリンパ節転移および骨転移と診断され, 肘静脈血より腫瘍細胞 (Fig. 22) を検出後, 約1カ月で死亡. 腫瘍細胞は Giemsa 染色標本の末端部に近く検出された. その細胞はかなり変性が強いが, 細胞径は 25μ で大きく, 胞体は比較的大い. 好塩基性で泡沫様の空胞形成をみる. 核は核質にとみ, 小塊状に分布する. 核小体は不明瞭.

肉腫患者群17例では, リンパ肉腫の1例 (白血性), 慢性リンパ性白血病の2例 (いずれも白血性), 細網肉腫の2例 (うち1例は白血性) および悪性リンパ腫の1例, 計6例 (35.3%) に腫瘍細胞を検出した. 下に末梢血中の腫瘍細胞の検出が診断の端緒となった興味ある悪性リンパ腫の1例について概要を述べる.

症例: 34歳, 男子

昭和40年12月より背部痛, 弛張性高熱が起こり, 昭和

41年4月九大第1内科に入院。諸検査によるも原因が確認できず、5月20日、肘静脈血より腫瘍細胞 (Fig.23および24) を検出し、ついで胸骨骨髓穿刺液より同様の腫瘍細胞を検出し、さらに1週後より右頸部リンパ節の腫脹に気づき、生検の結果、悪性リンパ腫と診断され、腫瘍細胞検出後約2週で死亡。腫瘍細胞は、Giemsa 染色で細胞径 40μ で大きく、胞体は弱好塩基性で、多数の小空胞を認める。核は単核または2核で、核膜は薄く、核構造は網状せん細、大型不整の核小体を数コ認める。細胞の大型化、胞体の空胞、核膜が薄く、核構造のせん細な点などより非上皮性腫瘍細胞と考えられた。

3. 考按ならびに総括

3.1. 腫瘍細胞分離方法としての dextran 法の検討

流血中腫瘍細胞を選択的に分離する方法のうち現在も用いられているものは、ヘマトクリット法に準じて血液中の赤血球を除く方法^{51,57)}、saponin⁷⁾ や streptolysin-O²²⁾ などによる溶血法、および fibrinogen⁴³⁾、dextran⁹⁾、かぶとがに異種血球凝集素⁶¹⁾ やアラビヤゴム⁴⁴⁾ などを用いて赤血球沈降を促進させる方法などである。一方、白血球を除く方法としては、streptolysin-O²²⁾ による選択的溶解法および貪食能を利用した magnet¹⁸⁾ 法などがある。また、細胞の比重差を利用して腫瘍細胞を選択的に分離する浮遊法⁴⁶⁾ や細胞の大きさの差を利用する filter 法^{8, 47, 62)} さらに以上に適当に組み合わせる方法^{22, 28, 29, 46)} など多数の分離方法が開発されてきた。

これら技法の優劣を比較するには、既知の数の腫瘍細胞を印づけして血液に混入し、腫瘍細胞の回収率をみる方法^{37, 52, 54, 60)} が採択されているが、それによると、量的には溶血法、浮遊法および filter 法が、dextran などによる赤血球沈降促進法より優れ、標本作成上では塗抹標本より Millipore filter を用いた方が回収率の点で優れているという。しかし Northrop ら³⁰⁾ は、2枚のカバー硝子の間に被検体の1滴をはさんで薄く引き伸ばして標本を作成、観察しているが、その回収率は Millipore filter のそれと差がなく、細胞鑑別の面からはこの塗抹標本法が優れているとした。

一方、von Haam および Stevenson⁵⁹⁾ は、癌患者の屍体血を用いて赤血球沈降促進法と溶血法とを比較したが、両法の検出率に有意の差を認めなかった。

つぎに、末梢流血中の腫瘍細胞検出率については、Moore ら²⁷⁾ は fibrinogen 法で細胞を収集、塗抹標本で観察して 52.0% の検出率を得、ついで同様の方法により Roberts ら³⁹⁾ は 16.3%、田崎ら⁵⁵⁾ は 29.2%、Stofberg⁵⁸⁾ は 4.0% とまちまちの値を出している。また Pimenta

de Mello³³⁾ は赤血球沈降促進法で細胞を収集し、塗抹標本を acridin-orange で染めて観察して、96.5% の検出率を得、Jackson¹⁴⁾ は同じ方法で 0% というまったく違った値を出している。さらに宇野⁵⁷⁾ は回収率の劣るとみなされる³⁶⁾ ヘマトクリット法で収集し、塗抹標本で観察して 60.3% という高い検出率を出しているのに、他方、Nedelkoff ら²⁹⁾ は、優れた回収率を示す saponin 溶血法に Millipore filter を組み合わせた方法によって観察して、1.0% というきわめて低い検出率を出している。

このような回収実験結果と実際の流血中腫瘍細胞検出率との矛盾は、腫瘍細胞分離方法の相違によるものではなく、流血中腫瘍細胞の判定基準の相違に基づくものとすれば、一応容易に説明されよう。そこで、細胞の収集、標本作成過程において、細胞の変性を最小限にとどめることが細胞同定の正確を期する上にもっとも重要な課題となる。Malmgren²³⁾ も指摘したように、溶血法では腫瘍細胞の形態学的変性が起こり、filter 法では細胞の破片が膜面にみられ、また細胞が網目に引っかかった状態で観察されるので、細胞の細かい観察には適当でない。しかも、Millipore filter には Giemsa 染色が施されない不利がある。流血中にみられる細胞の大半が造血器に由来するので、腫瘍細胞との鑑別には Giemsa 染色は不可欠である (木村ら¹⁶⁾)。竹内ら⁵⁴⁾ は、各種の腫瘍細胞分離法について検討し、労力、費用なども考慮して、血沈促進法も臨床的には捨てがたい方法であろうと結論している。

本研究では、以上の文献的考察より、腫瘍細胞の判定を正確にすることに重点をおき、操作過程で細胞の変性が少なく、かつ操作が簡便で、検査費が廉価でもある dextran 法で細胞を収集し、塗抹標本で観察することとした。dextran の濃度は Tullis⁵⁶⁾ にならい、分子量 188,000、最終濃度 0.8% とした。本法による有核細胞回収率は $65.7 \pm 9.4\%$ であった。Skoog および Beck⁵⁰⁾ は分子量 228,000 の dextran の 3% 濃度のものを最良とみなし、 $76 \pm 16\%$ の回収率を得ている。検体の性状も異にするので一概に比較評価はできないが、回収率としてはほぼ近似した値といえよう。

つぎに、この dextran 法による腫瘍細胞回収率をみるために、癌性腹膜炎患者の腹水で混入細胞回収実験の材料として諸条件に適したものを選んだ。従来、吉田肉腫細胞⁵⁴⁾ などの動物腫瘍細胞または HeLa 細胞⁵²⁾ などの培養細胞を材料に用いた報告が多いが、これらは実際に流血中に出現する腫瘍細胞とは形態学的にはかなり異なっており、本研究の目的には不適当と考え、たまたま

臨床的に求めやすい癌性腹水を材料とした。なお、塗抹標本では、塗抹の始端、末端付近は細胞の変性または凝集のために正確な観察ができがたいのが常である。回収実験ではこの点にも留意して回収率を算定せねばならないが、現在までにこの点を配慮した報告はみられない。印づけ細胞の混入実験では、回収率は血液 1 ml あたり 200 $\times$, 2,000 $\times$ の混入実験では 20%ないし 30%であり, Stevenson および von Haam⁵²⁾ の 1 ml あたり 10ないし 20 $\times$ 混入での回収率 17.1%に近似している。しかし良好標本部分のみに限ると, 15%以下と低下し, これは生細胞混入実験での回収率にほぼ一致した。dextran 法による混入細胞の回収率は, 他の方法と比較してかなり低く, 従来の報告^{35, 37, 52)}のとおりであった。しかし腫瘍細胞に変性をきたさない点で判定しきわめて優れた方法といえる。しかも dextran 法は操作が比較的簡単で, 実験費が廉価でもあり, 腫瘍細胞分離方法として十分に応用しうるものと考えられる。

3.2. 末梢流血中に出現する細胞の検討

流血中の腫瘍細胞を検出するには比較的多量の血液が使用されるので, 通常の血液塗抹標本でみられない各種の細胞をみることができる^{1, 16, 31, 53)}。

以下, dextran 法により観察しえた各種細胞について検討を加える。

赤芽球: 健康人群には全例に認めえなかったが, 癌の広汎転移群で 18%, 肉腫群で 41%に認められ, 腫瘍細胞の骨髓内転移と何らかの関連があることが示唆された。Stofberg⁵³⁾も進展癌で 36%に赤芽球を認めている。dextran 法では検出しがたいとの報告¹⁶⁾もあるが, 本実験では必ずしもそうではなかった。

未熟顆粒球: 前骨髓球, 骨髓球は, 健康人群で 93%に検出され, 検出率では各疾患群の間に有意の差はなかったが, 健康人群に比べて, 各疾患群では多数検出される傾向がみられた。Efrati および Rozenszajn⁶⁾は正常人 52例の buffy coat を検索し, うち 42例 (81%) に骨髓球ないし後骨髓球を認めている。Stofberg⁵³⁾は正常人 50例を fibrinogen による血沈促進法で検索し, 72%に骨髓球を認めている。他方, 矢戸ら⁴⁹⁾は溶血速沈法により健康人および各種疾患計 90例について観察したが, 全例で幼若骨髓球の出現を確認しえなかったという。しかし, 通常の血液塗抹標本でも, 詳細に観察すると, 炎症疾患などで, 幼若骨髓球をみることはよく経験するところであり, 有核細胞収集法により高率にみだしうる事実は容易に理解できる。小野ら³¹⁾は本法により類白血病反応の準備状態を指摘できるともいっている。

大型単核細胞: 胞体の好塩基性, 核網の小野形成, し

ばしばみられる大型の核小体などで特徴づけられる異型リンパ球がその大半を占めている^{1, 16, 31)}。そのほかリンパ球, 形質細胞または細網細胞の未熟型も含まれているようであるが, Giemsa 染色のみではこれ以上詳細な鑑別は不可能である。細胞の大型化, 胞体の好塩基性, 核質の増加および核小体の大型化などの点から腫瘍細胞と誤まれる可能性があるから, 十分注意する必要がある。

核分裂像: 田崎ら⁵⁵⁾は核分裂像をもって悪性細胞の一特徴としているが, これは非腫瘍細胞に由来するとの報告も多い^{1, 11, 53)}。本研究では, 健康人群で 4例, 非腫瘍疾患群で 7例に認めており, 核分裂像をもって悪性規準とすることの誤まりを指摘したい。もちろん, 腫瘍細胞由来の異常分核像を検出同定できる例もあった。

組織球: 細胞が大型で核が偏在し, 印環細胞をなす組織球では, 印環細胞型の腫瘍細胞との鑑別が困難となる。胞体の汚ない色調, 核の構造または核小体の数, 大きさなどにより慎重な鑑別を要する。

その他, 組織肥胖細胞, 内皮細胞, および破骨細胞など, 通常の末梢の血液塗抹標本ではみられない細胞が認められた。内皮細胞ではシート状¹⁾をなすことが多く, これについては Herbeuval ら¹⁰⁾の詳細な報告がある。

骨髓巨核球: 骨髓巨核球の末梢血への出現については, 古くは Minot²⁶⁾の報告などがある。近年, 流血中の腫瘍細胞を検出する目的で多量の血液を処理, 観察するようになり, Long ら²⁰⁾, Alexander および Spriggs¹⁾, 小野ら³¹⁾は腫瘍細胞とまぎらわしい細胞として骨髓巨核球をあげ, さらに Raker ら³⁸⁾は 144例の研究において, 初期の観察では 62例に腫瘍細胞を検出したとしたが, 後に骨髓巨核球を誤認していたことに気づき, 最終的には 2例にのみ腫瘍細胞を検出しえたと報じ, Kierszenbaum および Tres¹⁵⁾も 117例の検討で初期には 46例に腫瘍細胞を認めたとしたが, その後, 骨髓巨核球の詳細な検討により, 14例を陰性に改めたと報じている。骨髓巨核球の鑑別のために Valaitis および McGrew⁵⁸⁾は骨髓細胞を, McGrew ら²⁴⁾は流血中の骨髓巨核球を Papanicolaou 染色により詳細に検討, Jackson¹⁴⁾は periodic acid-Schiff 反応を用い, Herbeuval ら^{11, 12)}は immunofluorescence assay により骨髓巨核球と腫瘍細胞との鑑別を報じている。

末梢流血中にみられる骨髓巨核球の形態学的特徴は, 通常の骨髓穿刺液でのそれに比べて裸核が多く, 核径も減少, 核は老熟かつ濃縮したものが多い。骨髓穿刺液を dextran 法で処理して, 胞体, 核径について比較した結果, これらの変化は, 操作過程における変性とは考え

られない。健康人群と癌患者群とでの核径の比較では、広田¹³⁾と同じく有意の差を認めなかった。また、Romsdahl¹⁴⁾が報じた広汎転移癌患者の流血中骨髓巨核球の核の性状の変化については、染色法の相違もあり、認めえなかった。

流血中の骨髓巨核球に関しては、Efrati および Rozenszajn⁶⁾は健康人でも全例に認め、Alexander および Spriggs¹⁾も正常人および各種疾患患者のほぼ全例に認めている。Jackson¹⁴⁾は癌患者を主として検索して89.6%，Raker¹⁵⁾は42%，Scheinin および Koivuniemi⁴⁵⁾は癌患者で72%，非癌患者で60%に認めている。広田¹³⁾は健康人で25.4%，胃癌患者では41.2%に、他部位の癌患者で42.0%と癌患者で増加の傾向をみ、検出率と貧血との関係を重視している。本研究では健康人でも87%に認め、各種疾患群との間で有意の差を認めえなかった。

しかし、出現した骨髓巨核球数を各例ごとに検討した結果、健康人群に比較して各種疾患患者群とくに膠原病や癌患者群で骨髓巨核球は多数出現し、なかでも癌患者では、限局群に比べ、遠隔転移群により多数出現した。Scheinin および Koivuniemi⁴⁵⁾は炎症や貧血を伴った進展癌で増加をみ、Romsdahl¹⁴⁾も進展癌や急性炎症期、膠原病または血液疾患において増加することを報告している。Landell¹⁹⁾は、癌細胞とまぎらわしい大型の異型細胞を乳癌例で66%に、対照群では45%にみ、1検体あたりの異型細胞出現数は癌群に多い傾向があることをみたが、癌の進展度によって差はみられなかったと報じている。骨髓巨核球の骨髓外への流出に関連して、Seebach および Kernohan⁴⁸⁾は肺毛細管における骨髓巨核球を検討し、急性炎症で多数みだしたと報じた。よって、肺疾患の有無による骨髓巨核球の末梢血中への出現を検討した。良性疾患群では肺陰影の有無によって差はなく、肺での骨髓巨核球の抑留および放出を思わせる所見はえられなかった。癌患者群では転移の有無による差よりも肺陰影の有無により顕著な差がみられた。これは、肺と骨髓巨核球数の関係を示すものではなく、血行性転移による骨髓への侵襲、あるいは刺激による流血中骨髓巨核球数の増加と考えられ、肺転移は血行性転移の一表現とみなされる。

骨髓での骨髓巨核球の異常と流血中への出現数との関係について、Landell¹⁹⁾は真性多血症に基づく骨髓線維症の2例において、10mlの血液よりそれぞれ236コ、695コ検出した。本研究でも、出血性血小板血症の2例で、他の症例にみられないほど多数の骨髓巨核球を検出し、一方、骨髓像で骨髓巨核球が極度に減少した再生不

良性貧血の3例では、全例を通じてわずかに1コの裸核をみたにすぎない。

以上のように、流血中の腫瘍細胞の検出には、これとまぎらわしい大型あるいは異型の細胞を鑑別しなければならぬが、癌患者では貧血をきたし、あるいは炎症を合併することも多く、さらに進展癌では骨髓への侵襲もあり、骨髓巨核球を中心に多数の異型細胞が出現する機会は多い。このような造血器由来の細胞の鑑別には、Giemsa 染色を適用するのが好ましい¹⁶⁾。また細胞化学、免疫蛍光法などによる精細な細胞鑑別も今後に期待される。

腫瘍細胞：末梢流血中の癌細胞は、検索した癌患者群45例中、3例(6.7%)に検出したにすぎない。なお、検出した3例とも癌細胞はいずれも単離してみられ、細胞集団としてみだすことはできなかった。症例あたりの出現癌細胞数もきわめて少数で、5コ未満であった。

末梢血中の腫瘍細胞検出率は、細胞分離方法のいかんによることなく、骨髓巨核球をはじめ、各種の異型細胞との鑑別を強調した研究者は概して低率を報じており¹⁾ 11, 14, 15, 25, 29, 31, 45, 53, 高率の検出成績^{2, 7, 27, 33, 34, 36, 46, 51, 55, 57)}は組織球、大型単核細胞または骨髓巨核球などの大型化、あるいは異型化したものを腫瘍細胞と誤認したものと考えられる。

Alexander および Spriggs¹⁾の腫瘍細胞出現例では、全例6カ月以内に死亡している。一方、Pimenta de Mello³³⁾は無症状の癌患者でも高率に癌細胞を認めたとしている。腫瘍領域血を材料とした場合には、治療可能な患者でも腫瘍細胞を検出しようとの報告は多い^{39, 42, 45)}。本研究の観察例では、末梢血に腫瘍細胞を検出した3例はいずれも遠隔転移を伴った進展癌であり、癌細胞検出後5カ月以内に死亡した。

悪性リンパ腫では、Stoffberg⁵³⁾は、50例のホジキン病の末梢血を検索し、5例に腫瘍細胞を認めたが、全例6カ月以内に死亡した。本研究の観察例でも、慢性リンパ性白血病を除けば、いずれも腫瘍細胞検出後6カ月以内に死亡した。Bierman³⁾はbuffy coatでの異常細胞により、リンパ腫を診断しうる可能性を指摘しているが、腫瘍細胞がリンパ球または細胞に類似する場合があり、一方、炎症などによるいわゆる異型リンパ球が多数出現する例もしばしば経験するところであり、慎重な鑑別を要する。

本研究における観察例中、悪性リンパ腫で、表在リンパ節の腫脹に気づく以前に末梢血より腫瘍細胞を検出し、これが診断の端緒となった1例がある。偶然のことかもしれないが、注意深い血液検査が潜在疾患を摘発す

る可能性を示す1例である。

4. 結 語

1. 流血中腫瘍細胞の分離方法として dextran による赤血球沈降促進法を選び、既知数の人腹水中の癌細胞を生細胞および印づけ細胞として、正常人血液に混入して回収実験を行なった。回収率は、操作過程、さらに塗抹過程での細胞の損失が多いため、15%程度でかなり低い。細胞の変性が少なく、細胞の鑑別にはきわめて有用であり、腫瘍細胞分離方法として十分使用しうることを知った。

2. 健康人および各種疾患患者合計130例の末梢血各5 ml を dextran 法により処理し、塗抹標本を作成し、主として Giemsa 染色を施して観察し、以下の結果を得た。

1) 通常の血液塗抹標本では、稀にしかみられない赤芽球、未熟顆粒球、異型リンパ球を主とする大型単核細胞およびこれらの細胞に由来すると思われる核分裂像を比較的容易にみいだした。

2) 腫瘍細胞と誤まりやすい細胞として、大型の組織球を8例、6.2%に、細胞集団としてみられることの多い内皮細胞を7例、5.4%に認めた。

3) 細胞の大型化、核形の異常、核質の増加などにより、腫瘍細胞と慎重な鑑別を要する骨髓巨核球は、健康人群で87%に認め、癌を含む各種疾患群との間に有意の差を認めなかった。しかし、骨髓巨核球数は、健康人群に比べて、非腫瘍疾患患者群、癌患者群では増加し、とくに癌の遠隔転移群、さらに血行性転移群ではより多数を認めた。

4) 癌患者群45例中、3例、6.7%にのみ癌細胞を検出した。いずれも遠隔転移を伴った進展癌であり、検出後、5ヵ月以内に死亡した。

5) 肉腫患者17例中、経過中に白血性を呈した4例を含み、計6例、35.3%に腫瘍細胞を検出した。

稿を終るにあたり、ご校閲を賜った柳瀬敏幸教授に深甚の謝意を表するとともに、終始ご懇篤なご指導をいただいた服部絢一助教授に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第5回および第6回日本臨床細胞学会総会において発表した。

Summary

Recently, numerous studies on the detection of tumor cells in the peripheral blood have been made from the view-points of diagnosis, prognosis and evaluation of therapeutic effects. The incidence of tumor cells in the peripheral blood varies

widely, ranging from less than 1% to 96.5% (Table 1). An extensive review of the literature has indicated that this great diversity might be attributable mainly to differences in the criteria for the recognition of malignant cells rather than in the techniques for tumor cell isolation. Therefore, it would be important to select the technique which is excellent in both reproductivity and cell preservation. In the present study a dextran sedimentation and smearing technique was selected for the detection of tumor cells in the circulating blood, and this procedure was evaluated by the tumor cell recovery test, using human cancerous ascites cells, stained and unstained (Table 2). The results indicated that the dextran sedimentation technique possessed an advantage in well preserving the cell morphology, but, the recovery rate, as described in the previous literature, was rather low as compared with those by other methods.

By the use of the dextran sedimentation technique, tumor cells appearing in the peripheral blood from 130 subjects, which comprised 30 healthy subjects, 38 noncancerous patients, 45 patients with carcinomas and 17 with sarcomas (Table 3), were observed with a care of ruling out the cells which were not usually observable in the peripheral blood.

1. There were found even in the samples from healthy subjects a relatively good number of benign cells such as erythroblasts, immature granulocytes, large mononuclear cells which possibly would be atypical lymphocytes, monocytes, plasmocytes and their mitotic figures (Table 4).

2. Large histiocytes were seen in 8 cases (6.2%) and occasionally became signet ring cells which might be apt to be confused with tumor cells. Endothelial cells were also seen in 7 cases (5.4%).

3. Megakaryocytes may not infrequently be confused with tumor cells for their large size (Table 5), clumping of the nuclear chromatin and irregularity in the nuclear membrane. Megakaryocytes were found at a high frequency (87%) of healthy subjects, and increased in number in patients with various diseases (Table 6), especially, in patients with disseminated cancers (Table 7 and 8).

4. In the present study tumor cells were detected in only 3 patients (6.7%) with disseminated cancers and in 6 patients (35.3%) with sarcomas (Table 9). All patients expired within 5 months after the first detection of tumor cells in the peripheral blood.

文 献

- 1) Alexander, R. F. & Spriggs, A. I. : The differential diagnosis of tumor cells in circulating blood, *J. Clin. Path.*, **13** : 414~424, 1960.
- 2) 浅川 洋 : 放射線科領域における悪性腫瘍患者の末梢静脈血の細胞学的研究 (第1報), 末梢流血中における腫瘍細胞の検出とその臨床的意義, *日本医放会誌*, **21** : 1203~1216, 1962.
- 3) Bierman, H. R., Marshall, J. & Winer, M. L. : The prediagnostic state of lymphoma, *J. A. M. A.*, **186** : 185~192, 1963.
- 4) Burks, J., Migaiolo, J. & Watne, A. L. : Tumor cells in the blood. I. Quantitative recovery by sedimentation and hemolytic techniques, *Acta Cytol.*, **11** : 92~97, 1967.
- 5) Christopherson, W. M. : Cancer cells in the peripheral blood ; A second look, *Acta, Cytol.*, **9** : 169~174, 1965.
- 6) Efrati, P. & Rozenszajn, L. : The morphology of buffy coat in normal human adults, *Blood*, **16** : 1012~1019, 1960.
- 7) Engell, H. C. : Cancer cells in the circulating blood, *Acta Chir. Scand. Suppl.*, **201** : 1~70, 1955.
- 8) Foss, O. P., Messelt, P. T. & Efskind, L. : Isolation of cancer cells from blood and thoracic lymph by filtration, *Surgery*, **53** : 241~246, 1963.
- 9) Graham, R. M. : The cytologic diagnosis of cancer, 2nd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1963.
- 10) Herbeuval, H., Fourot, M., Hettich, C. & Herbeuval, R. : Endothelial cells and circulating-blood clumps ; Differential diagnosis, *Acta Cytol.*, **9** : 68~72, 1965.
- 11) Herbeuval, R., Herbeuval, H. & Duheille, J. : Technique for demonstrating the presence of cancer cells in the blood, *Leucocyte concentration, Triangle*, **6** : 47~52, 1963.
- 12) Herbeuval, R., Duheille, J. & Goedert-Herbeuval, C. : Diagnosis of unusual blood cells by immunofluorescence, *Acta Cytol.*, **9** : 73~82, 1965.
- 13) 広田 豊 : 末梢血液中骨髓巨核球に関する研究, *日血会誌*, **29** : 833~844, 1966.
- 14) Jackson, J. F. : Histochemical identification of megakaryocytes from peripheral blood examined for tumor cells, *Cancer*, **15** : 259~262, 1962.
- 15) Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L. : Differential diagnosis of megakaryocytes from cancer cells in peripheral blood, *Acta Cytol.*, **8** : 91~94, 1964.
- 16) 木村禧代二, 柏田直俊, 増田礼子, 岡田京子 : 流血中の癌細胞と異型細胞, *日本臨床*, **24** : 1903~1909, 1966.
- 17) Koss, L. G. & Durfee, G. R. : Diagnostic cytology and its histopathologic bases, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1961.
- 18) Kuper, S. W. A., Bignall, J. R. & Luckcock, E. D. : A quantitative method for studying tumor cells in blood, *Lancet*, **1** : 852~853, Apr. 22, 1961.
- 19) Landell, N. E., Silván, A. & Zajicek, J. : Atypical cells in peripheral blood in 100 cases of mammary carcinoma and 100 controls, *Acta Cytol.*, **7** : 91~96, 1963.
- 20) Long, L., Roberts, S., McGrath, R. & McGrew, E. : Simplified technique for separation of cancer cells from blood, *J. A. M. A.*, **170** : 1785~1788, 1959.
- 21) 榎 哲夫, 間島 進, 吉田 弘一, 高橋 俊雄 : Cancer cell dissemination during surgical manipulation, *Tohoku J. Exper. Med.*, **79** : 319~333, 1963.
- 22) Malmgren, R. A., Pruitt, J. C., Del Vecchio, P. R. & Potter, J. F. : A method for the cytologic detection of tumor cells in whole blood, *J. Nat. Cancer Inst.*, **20** : 1203~1213, 1958.
- 23) Malmgren, R. A. : Problems in techniques used in blood specimen preparation, *Acta Cytol.*, **9** : 97~99, 1965.
- 24) McGrew, E. A., Romsdahl, M. M. & Valaitas, J. : Differentiation of hepatopoietic elements from tumor cells in blood, *Acta Cytol.*, **6** : 551~553, 1962.
- 25) Meisels, A. & Dubreuil-Charrois, M. : Atypical cells in peripheral blood, *Acta Cytol.*, **9** : 257~263, 1965.
- 26) Minot, G. R. : Megakaryocytes in the peripheral circulation, *J. Exper. Med.*, **36** : 1~8, 1922.
- 27) Moore, G. E., Sandberg, A. & Schubarg, J. R. : Clinical and experimental observations of the occurrence and fate of tumor cells in the blood stream, *Ann. Surg.*, **146** : 580~587, 1957.
- 28) Nedelkoff, B., Christopherson, W. M. & Harter, J. S. : A method for demonstrating malignant cells in the blood, *Acta Cytol.*, **5** : 203~205, 1961.
- 29) Nedelkoff, B., Christopherson, W. M. & Harter, J. S. : A study of abnormal cells in the peripheral circulation of patients with lung cancer, *Acta Cytol.*, **6** : 319~324, 1962.
- 30) Northrop, G. T., Patten, S. F., Jr. & Reagan, J. W. : A comparative experimental study

- of technics for tumor cell isolation from blood, *Acta Cytol.*, **9** : 134~135, 1965.
- 31) 小野三郎, 森 栄吉, 広田 豊, 渡辺達郎: 癌患者末梢血液中の異常細胞の検討, *最新医学*, **15** : 3244~3250, 1960.
 - 32) Papanicolaou, G. N. : *Atlas of exfoliative cytology*, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1954.
 - 33) Pimenta de Mello, R. : A new method for detection of cancer cells in peripheral blood using the Bertalanffy fluorochrome method, *Acta Cytol.*, **7** : 62~65, 1963.
 - 34) Pool, E. H. & Dunlop, G. R. : Cancer cells in the blood stream, *Amer. J. Cancer*, **21** : 99~102, 1934.
 - 35) Pradier, R. & Sako, K. : Evaluation for tumor cell recovery from bloody fluids; An experimental study, *Cancer*, **17** : 314~317, 1964.
 - 36) Pruitt, J. C., Hilberg, A. W., Morehead, R. P. & Mengoli, H. F. : Quantitative study of malignant cells in local and peripheral circulating blood, *Surg. Gynec. & Obst.*, **114** : 179~188, 1962.
 - 37) Pruitt, J. C., Powell, R. V. & Prater, T. F. K. : A quantitative comparison of processing techniques for study of circulating malignant cells, *Acta Cytol.*, **9** : 116~122, 1965.
 - 38) Raker, J. W., Taft, P. D. & Edmonds, E. E. : Significance of megakaryocytes in the search for tumor cells in the peripheral blood. *New Engl. J. Med.*, **263** : 993~996, 1960.
 - 39) Roberts, S., Watne, A., McGrath, R., McGrew, E. & Cole, W. H. : Technique and results of isolation of cancer cells from the circulating blood, *Arch. Surg.*, **76** : 334~346, 1958.
 - 40) Romsdahl, M. M., Potter, J. F., Malmgren, R. A., Chu, E. W., Brindley, C. O. & Smith, R. R. : A clinical study of circulating tumor cells in malignant melanoma, *Surg. Gynec. & Obst.*, **111** : 675~681, 1960.
 - 41) Romsdahl, M. M., Valaitis, J., McGrath, R. G. & McGrew, E. A. : Cytological changes of megakaryocytes in patients with carcinoma, *Acta Cytol.*, **8** : 343~347, 1964.
 - 42) Sakurai, M., Klassen, K. P. & Selbach, G. J. : The presence of malignant cells in the blood of patients with carcinoma of the lung, *Acta Cytol.*, **6** : 314~318, 1962.
 - 43) Sandberg, A. A. & Moore, G. E. : Examination of blood for tumor cells, *J. Nat. Cancer Inst.*, **19** : 1~11, 1957.
 - 44) 佐藤春郎, 宗像秀雄: 血中の癌細胞, *癌の臨床*, **6** : 3~12, 1960.
 - 45) Scheinin, T. M. & Koivuniemi, A. P. : Large benign cells in circulating blood and their significance in the identification of cancer cells, *Cancer*, **15** : 972~977, 1962.
 - 46) Seal, S. H. : Silicone flotation; A simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood, *Cancer*, **12** : 590~595, 1959.
 - 47) Seal, S. H. : A sieve for the isolation of cancer cells and other large cells from the blood, *Cancer*, **17** : 637~642, 1964.
 - 48) Seebach, L. M. & Kernohan, J. W. : Megakaryocytes in the pulmonary capillaries, *Am. J. Clin. Path.*, **22** : 646~651, 1952.
 - 49) 穴戸英雄, 中川正男, 山口建美, 天川孝男: 溶血遠沈法による血中有核細胞の観察, *臨床血液*, **6** : 240~242, 1965.
 - 50) Skoog, W. A. & Beck, W. S. : Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin method of isolating leukocytes, *Blood*, **11** : 436~454, 1956.
 - 51) Stein, A. A., Harding, R. & Mauro, J. : A simple method for identification of circulating cancer cells, *Acta Cytol.*, **6** : 273~277, 1962.
 - 52) Stevenson, T. D. & von Haam, E. : Cancer cells detection in the peripheral blood, II. Comparison of techniques using seeded specimens, *Acta Cytol.*, **9** : 111~115, 1965.
 - 53) Stoffberg, A. M. M. : The significance of the leucocyte concentrate in the demonstration of tumor cells in the blood, *Acta Haemat.*, **29** : 65~79, 1963.
 - 54) 竹内正七, 松枝和夫, 吉田武彦, 羽生藤伍: シリコン法を中心とする流血中癌細胞の分離検出法の検討, *最新医学*, **15** : 1358~1364, 1960.
 - 55) 田崎勇三, 古江 尚, 高月英夫, 富永仁示, 淵上在弥, 太田邦夫: 癌患者の末梢流血中の癌細胞, *癌の臨床*, **6** : 472~474, 1960.
 - 56) Tullis, J. L. : Separation and purification of leukocytes and platelets, *Blood*, **7** : 891~896, 1952.
 - 57) 宇野広治: 癌患者の静脈血中の癌細胞の検索, *最新医学*, **13** : 2641~2649, 1958.
 - 58) Valaitis, J. & McGrew, E. A. : Cytologic study of bone marrow cells by the Papanicolaou method, *Acta Cytol.*, **5** : 241~244, 1961.
 - 59) Von Haam, E. & Stevenson T. D. : Cancer cell detection in the peripheral blood, I. Comparison of techniques using cadaver blood, *Acta Cytol.*, **9** : 100~109, 1965.
 - 60) Watne, A. L. : The isolation of tumor cells from the blood; Approaches to technique comparison, *Acta Cytol.*, **9** : 123~133,

1965.

- 61) Watne, A. L., Cohen, E., Migaiolo, J. A. & Lyon, V. E. : Tumor cell and leukocyte recovery from human blood utilizing Limulus heteroagglutinins, *Acta Cytol.*, 10 : 255~

260, 1966.

- 62) West, J. T., Hume, R. & Kindurys, A. : A one-step filtration technic for recovery of tumor cells from blood, *Am. J. Clin. Path.*, 41 : 27~32, 1964.
-

Fig. 1. Human cancerous ascites cells as a seeding material for the tumor cell recovery test.

Fig. 2. A seeded tumor cell, added in an unstained state. Giemsa.

Fig. 3. A stained tumor cell appearing in the unstained blood smear.

Fig. 4. A promyelocyte from a healthy subject. Giemsa.

Fig. 5. A large mononuclear cell from a patient with tuberculosis of the lung. Giemsa.

Fig. 6. A large mononuclear cell from a patient with rheumatoid arthritis. Giemsa.

Fig. 7. A mitotic figure from a patient with acute hepatitis. Giemsa.

Fig. 8. A mitotic figure from a healthy subject. Giemsa.

Fig. 9. A histiocyte from a patient with tuberculosis of the lung. Giemsa.

Fig. 10. A histiocyte from a patient with hepatoma. Giemsa.

Fig. 11. A histiocyte from a patient with Hodgkin's disease. Giemsa.

Fig. 12. A histiocyte from the same case as in Fig. 11. Giemsa.

13

14

15

16

17

18

Fig. 13. Endothelial cells from a patient with carcinoma of the stomach. Giemsa.

Fig. 14. A multinucleated giant cell from a patient with hemorrhagic thrombocythemia. Papanicolaou.

Fig. 15. A megakaryocyte from a healthy subject. Giemsa.

Fig. 16. A megakaryocyte from a patient with carcinoma of the kidney. Giemsa.

Fig. 17. A megakaryocyte from a patient with hemorrhagic thrombocythemia. Giemsa.

Fig. 18. A megakaryocyte from the same patient as in Fig. 16. Giemsa.

Fig. 19. A tumor cell from a patient with carcinoma of the breast. Giemsa.

Fig. 20. A tumor cell in mitosis from the same patient as in Fig. 19. Giemsa.

Fig. 21. A tumor cell from a patient with carcinoma of the stomach. Giemsa.

Fig. 22. A tumor cell from a patient with carcinoma of the stomach. Giemsa.

Fig. 23. A tumor cell from a patient with malignant lymphoma. Giemsa.

Fig. 24. A tumor cell from the same patient as in Fig. 23. Giemsa.