尿路悪性腫瘍患者の流血中異形細胞に関する研究

第 3 編 腫瘍細胞判定に関する実験的研究

札幌医科大学皮膚泌尿器科教室 大学院学生 井 川 欣 市
(主任: 高井修道教授)

STUDIES ON ATYPICAL CELLS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH UROLOGICAL TUMOR

REPORT 3. STUDY ON IDENTIFICATION OF TUMOR CELL

Kin-ichi Igawa

Department of Urology and Dermatology, Sapporo Medical College

(Director: Prof. S. Takai)

緒 言

可成り効率の良い腫瘍細胞の集収法が現在迄に考案されて来たのに反し、流血中の腫瘍細胞の診断は依然解明されていない。その原因の 1 つとして腫瘍細胞に対する特殊染色がないことがまずあげられる。次には腔塗抹標本に於ける如き剥離細胞診とは異なり流血中の場合は出現細胞数が少く細胞集塊を形成することは稀れであり、従つて *anisokaryosis* あるいは *anisocytosis* をはじめとする細胞相互間の変化を比較することが困難であること、加うるに前述の集収法を用いた場合血液塗抹標本ではみられないような稀有な細胞に遭遇することがあり形態学的には鑑別困難な場合が少なくないこと等に起因していると考えられる。それ故に流血中の腫瘍細胞の検索にあつては血液細胞学に習熟していることは勿論、自己の関与する悪性腫瘍について個々の細胞及び核構造の変化を詳細に検討しておくことが望ましい。私は組織学的に証明された尿路悪性腫瘍患者について手術時に切除した腫瘍組織の直接塗抹標本を作成し *Papanicolaou* のあげた悪性判定の総括的基準に照らし個々の細胞を無差別的に検討し尿路悪性腫瘍患者の血中に出現する異型細胞と比較しようと試みた。

実験材料:

淡明細胞型	1 例
混 合 型	1 例
腎盂腫瘍	
移行上皮癌第Ⅲ度	1 例
膀胱腫瘍	

移行上皮癌第Ⅲ度

4 例

計 7 例

実験方法

悪性腫瘍患者の腫瘍組織を切除し直ちに新鮮な切除組織を綿棒で軽く擦過しスライドガラスに塗抹した後、*May-Giemsa*, *Papanicolaou*, *PAS-Hematoxylin* 及び *Unna-Pappenheim* 染色等を試み比較検討した。染色法については *May-Giemsa*, *Papanicolaou* 染色が優れている。特に前者は細胞の微細構造を観察する目的と既知の造血臓器由来の細胞を正しく判定し腫瘍細胞と鑑別するという観点より未だ重要な染色法であると考え、主として *May-Giemsa* 染色法により各症例毎に 10 枚の腫瘍直接塗抹標本を作成し症例ごとに無差別的に 400 個の細胞を *Papanicolaou* の悪性判定の総括的基準 (I. 細胞の変化) に照らし顕微鏡下に観察した。

実験結果 (第 1 表)

各症例毎に観察細胞の何パーセントが該当項目を満たすかについて検討すると次の如くである。

A. 核の変形

1. 核・細胞質比の増大を伴う不平衡な核の肥大についてみると裸核細胞を除いて検討すると各症例共 100% にこれを認めることが出来た。この結果からみても核肥大ということは悪性細胞判定の最も重要な判定基準の 1 つであると考えられる。又裸核細胞の核も異常に増大していることを殆ど全裸核細胞に観察された。

2. クロマチン含量の増加 (過染性) については最低率の症例で 73%, 最高率症例では 100% となつている。

第1表 腫瘍組織直接塗抹標本に於ける悪性判定の総括的基準 (Papanicolaou) に関する項目別検討 (%)

		核 の 変 形										細胞質内の変化			細胞全体としての変化		
		核細胞質比	うの増大を伴	核の肥大が不均等な	クロマチン含量の増加	クロマチン配分の不均等	核小体の肥大増	形態の不整を伴	頻繁な核分裂像	核膜の肥厚	核内に起る空胞	細胞質染色性の変化	細胞質内の包含	異形空胞形成	巨大化	形長の変化殊に細胞	退行性変性壊死
症 例	組織学的診断	+	裸核														
1	腎 腫 瘍 (clear cell type)	98	2	95	96	91	8	10	66	24	45	12	70	98	67	32	
2	腎 腫 瘍 (mixed type)	86	14	100	94	94	18	36		4	86	14	36	96	52	32	
3	腎盂瘍腫 (transit. cell ca. III)	100	0	100	100	81	18	42	69	3	17	7	25	100	54	16	
4	膀胱腫瘍 (transit. cell ca. III)	100	0	100	100	77	13	28	54	10	10	0	22	98	74	70	
5	膀胱腫瘍 (transit. cell ca. III)	80	20	99	95	51	15	4	75	37	27	12	32	91	42	39	
6	膀胱腫瘍 (transit. cell ca. III)	96	3	100	99	96	18	16	76	10	21	6	36	97	74	77	
7	膀胱腫瘍 (transit. cell ca. III)	87	13	73	75	77	10	11	55	28	15	6	30	92	67	60	

3. クロマチン配分の不均等は最低率症例で75%, 最高率症例では 100%となっている。

4. 核小体の肥大, 増加については田崎, 他も指摘している如く核小体・核比の増大は必ずしも認められず核小体の増大は差程著明ではないが, その数が3~4個に増加しているものも可成りある。私の観察では一般に1個の異常に肥大した核小体を有するか, 肥大は著明ではないが, その数が2~4個に増加している細胞が観察されるかのいずれかで陽性率は最低73%, 最高 100%となっている。

5. 形態の不整を伴う多核の項目を満たす細胞は非常に低率で10~20%程度である。

6. 頻繁な核分裂像, 殊に異型核分裂像については最高42% (腎盂腫瘍), 最低4% (膀胱腫瘍No. 5) となっており異型核分裂像は予想外に少ない。

7. 核膜の肥厚については最低4%, 最高76%で4%という例外を除くと50~70%程度と考えられる。

8. 核内に於ける空胞化, 染色性の低下は腫瘍細胞が血中, 漿液, 尿中等に迷入し周囲環境より異物としての作用を受ける場合は別として, その頻度は4~37%程度で判定基準項目としての価値は低い。

B. 細胞質内の変化

1. 細胞質染色性の変化等については染色技術により変化を受け易いものであるが腎細胞癌に於いては45~86

%に認められ, 移行上皮癌細胞ではその変化は極めて低率である。

2. 細胞質内の包含体等については5~15%程度にこれをみるに過ぎない。

3. 異形空胞形成は腎細胞癌の clear cell type のものでは空胞形成を著明に認めた (70%) が, 移行上皮癌細胞では30%前後である。

C. 細胞全体としての変化

1. 巨大化は90~ 100%に認められ, 判定基準の重要項目の1つである。

2. 形の変化は40%~70%で変異範囲の幅が大きい。

3. 退行変性, 壊死等は80~80%内外と変異の幅が広い, これは腫瘍組織の採取部位によつて左右されるものと考えられる。核に退行変性を認めるものは稀れであつたが, 細胞質はキ弱化, 脱落ないしは膨化し始めているものをもつて退行変性陽性とした。

以上の如く腎細胞癌, 腎盂腫瘍及び膀胱腫瘍細胞を Papanicolaou の悪性判定の総括的基準に照し検討した。以上を総括すると次の如くである。

- 1. 核細胞質比の増大
- 2. クロマチン含量の増加
- 3. クロマチン配分の不均等
- 4. 核小体の肥大, 増加
- 5. 巨大化

図：1，腎細胞癌の組織像（Giemsa 染色）

図：2，膀胱腫瘍（移行上皮癌）の組織像（Giemsa 染色）

図：3，腎腫瘍（淡明細胞型）腫瘍直接塗抹標本（Giemsa 染色）

図：4，膀胱腫瘍（移行上皮癌）腫瘍直接塗抹標本（Giemsa 染色）

の5項目はいずれの悪性細胞も概ね満足していることが判明したのである。

考 按

Cowdry は核、細胞質内の変化で悪性細胞だけにみられ、正常細胞には絶対に認められない如何なる変化も存在しなく、亦その逆も存在しないことを明かにしている。Papanicolaou は悪性判定の総括的基準中、1項目のみで悪性細胞と診断し得る項目はなく常に総括的、総合的に判定しなければならないことを強調している。

次に自験例に於て腫瘍組織直接塗抹標本を観察する際、悪性判定の総括的基準のうちの何項目を満足する細胞が最も多いかを、A. 核の変化、B. 細胞質内の変化並びにC. 細胞全体としての変化について各観察細胞が満足する項目累計数を検討表示した(第2, 3表)。この場合も各症例毎に400個の細胞を無差別的に観察した。左側は核の変形に関する陽性項目累計数を、右側は細胞質内の変化並びに細胞全体としての変化に関する陽性項目累計数を表わしている。

腎細胞癌の淡明細胞型について検討すると、先ず核の変形についてみると8項目の判定基準項目のうち5項目迄満足するものが41%で最も多く、次いで4項目(23%)、6項目(21%)の順となつている。細胞質内の変化及び細胞全体としての変化についてみると4項目を満たすものが29%、次いで5項目、3項目の順となつている。従つて、核の変形では8項目中5項目を満足するが、細胞質内の変化及び細胞全体としての変化では6項目中(4項目)を満足するものが最も多い、これを $\frac{5}{8}$ ($\frac{1}{2}$) と表示することにする。表に示めす如く頂点に近くなるに従つて悪性判定基準をより完璧に満たすことになるのであるが、悪性の判定基準を完全に満たす細胞には遭遇し得ず、 $\frac{5}{8}$ ($\frac{5}{8}$) が1.0%、 $\frac{7}{8}$ ($\frac{5}{8}$) が2%程度である。

腎実験腫瘍の淡明、顆粒細胞混合型では、核の変化の4項目を満たすものが40%、次いで5項目38%、6項目10%の順になつており、細胞質内の変化及び細胞全体としての変化では2項目を満足するものが最も多く、次いで4項目、3項目の順となつている。従つて本例に於いて

第2表 腫瘍組織直接塗抹標本の陽性項目累計

5 (2)
腎実質腫瘍
2例：観察細胞 800個

第3表 腫瘍組織直接塗抹標本の陽性項目累計

5 (3)
膀胱腫瘍 (移行上皮癌Ⅲ)
4症例：観察細胞 1,600個

では $\frac{1}{8}$ ($\frac{1}{8}$), $\frac{5}{8}$ ($\frac{5}{8}$) が最も多い結果を得た。以上の2例の成績を総括したのが第2表である。

腎盂腫瘍 (移行上皮癌Ⅲ度) についてみると核の変化では6項目を満たすものが最も多く39%, 次いで5項目を満たすものが36%である。細胞質内の変化及び細胞全体としての変化では1項目より満たさないものが最も多く、次いで3項目、4項目の順となる。従つて本例では $\frac{1}{8}$ ($\frac{1}{8}$), $\frac{5}{8}$ ($\frac{5}{8}$) が最も多く75%を占めている、

膀胱腫瘍 (移行上皮癌Ⅲ度) の4例、観察細胞1,600個についてみると、核の変化については5項目を満たすものが最も多く43.7%を占め、6項目、4項目を満たすものがそれぞれ20.2%を占めている。細胞質内の変化及び細胞全体としての変化についてみると、3項目を満たすものが最も多く30.4%を占め、次いで4項目の26.4%となっている。従つてこの場合は $\frac{5}{8}$ ($\frac{5}{8}$), $\frac{6}{8}$ ($\frac{3}{4}$), $\frac{4}{8}$ ($\frac{1}{2}$) 等で80%以上が占められている (第3表)。

渡部の流血中癌細胞の研究によれば癌細胞では直径20 μ 以上のものが検索細胞275個の65.5%を、面積で300 μ^2 以上のものが60.4%を占め、平均直径は22.7 μ , 平均面積は407.9 μ^2 であつたのに対し疑癌細胞と判定された細胞では直径20 μ 以下のものが72.9%を占め面積で300 μ^2 以下のものが76.5%を占め癌細胞と判定されたものに比較してやゝ小型のものが多いという。核・細胞質比については癌細胞および疑癌細胞とも50以上のものがそれぞれ全体の68.4~79.7%を占めていると述べている。核小体については私の腫瘍直接塗抹標所見では1個の異常に増大した核小体を有するか、差程肥大していないが2~4個の核小体を有する細胞が観察されており核小体の肥大増加を認めたものは73~100%であつたが渡部は癌細胞では検索286個の細胞中159個 (59.1%)に、疑癌細胞の63.9%に比較的大きい明瞭な核小体のみとめられ、癌細胞、疑癌細胞ともその半数以上に2~5個の核小体を有していたという。渡部は流血中の癌細胞と判定されたもの286個中17個 (5.9%)に核分裂像を認めているが私の腫瘍組織直接塗抹標本で異型核分裂像を示めたものは4~42%と出現頻度に可成の幅があることがわかつた。

腫瘍細胞の検索に染色法が問題になり各研究者により色々の染色法が試みられている。しかし繰返し述べた如く癌細胞だけ染出する特殊染色法がなく専ら形態学的所見の総合判定に基づいているのが現状であり Hematoxylin Eosin, Wright-Giemsa, May-Grünwald-Giemsa染色等の極めて簡単な染色法を用いている研究者も相当おり、少々時間を要するが Papanicolaou 染色法を採用している研究者が可成りみかけられる。やゝ特殊なものとして醋酸アエリン染色法 (熱海等), Acetopyoktaninblau 染色 (宇野) 等があげられる。蛍光顕微鏡, 位相差顕微鏡を用いている研究者も見うけられる。私は May-Giemsa, Papanicolaou, Wright-Giemsa, PAS-Hematoxylin 及び Unna-Pappenheim 染色等を予備実験として試みてみたが、流血中の異型細胞の検索には鑑別診断という点から

も観察者自身が最もなじみ深い染色法を採用するのが好都合であるとの結論に達した。

Papanicolaou 染色法は、原理的には切片標本のヘマトキシリン・エオジンの二重染色を施すと同じであり、その結果細胞質及び核染色がその内部構造に均等に及ぶ可能性がある。これに対して、**May-Giemsa** 染色法は、表面構造の染色が繊細に行われる代りに、内部構造、殊にガラス面側の細胞構造が、表面染色で掩われる怖れがある。例えば表面側の核膜がよく染色されるのに対して、その奥の核小体の構造が鮮明を欠く、殊に大型細胞である程この傾向が著しい。従つて腫瘍細胞の様な大型細胞では、その核小体の形、大きさ及び数等を判定するのには、多少不十分であるといわねばならない。これに反して **Papanicolaou** 染色は、組織切片を染めた場合のヘマトキシリン・エオジン染色の際に似て、細胞の好塩基性、細胞顆粒、核膜乃至網構造の微細な特徴は失われるが、核の形、核小体の性状、角化像等は、全体的に確かに把み得る可能性がある。従つて腫瘍細胞の観察が血球に於ける程の精密な特徴に及ぶ必要のない場合は **Papanicolaou** 法でもことたり得るということが出来る(武田)と述べている。

腫瘍組織直接塗抹標本を流血中腫瘍細胞の診断の補助手段に用いて流血中に出現した疑わしい細胞と対比することが望ましい。**Jonasson** 等は尿路悪性腫瘍患者の流血中腫瘍細胞の検索にあたり、その診断に **Papanicolaou** のあげた総括的基準に従うと同時に可能な限り切除組織の直接塗抹標本を参考にしたことを述べている。宇野は血液内の腫瘍細胞の種類と性状について単核細胞型、多核細胞型、封入細胞型、対細胞型、連繋細胞、島等に分類し、特に癌腫の検索には対細胞、封入細胞並びに島に注意をはらつたという。又彼によると血液内に見出された腫瘍細胞は体腔内に見出された腫瘍細胞と同じく、明瞭な核小体を有し、胞体は不透明感が強く好塩基性で胞体内に粘液顆粒(PAS 陽性)、光輝感顆粒(T.T.C. 陽性、**Sudan** 黒好性)が種々なる程度に認められると述べている。

Fisher & Turnbull も腫瘍直接塗抹標本と対比し形態学的に同一な流血中の細胞のみを腫瘍細胞とみなしており、腫瘍細胞には2型があると述べている。即ち、1型は集団で出現し円形の核を有するが2型は単独で出現し卵円形の核を有するという。両型細胞共顕著な核小体と核染色質塊を有し比較的細胞質に乏しく核・細胞質比の増大を認める。細胞質が脆弱なため2型の細胞質は塗抹標本では脱落しており判定はその核形態及び構造によ

らねばならない。細胞質の脆弱さは腫瘍直接塗抹標本上でもみられ私の実験に於ても観察細胞の20%に裸核細胞をみる症例もあつた。**Pruitt**等は流血中の悪性細胞の判定は差程困難でないとして述べているが、彼等によると通常認められている細胞診の基準がこの場合もあてはまるといふ。このうち細胞の大きさが最も重要であり、腫瘍細胞は標本上に於ける白血球の3~8倍の大きさで核は大きく濃染する。染色質は塊状をなし屢々核小体が見られる。核・細胞質比の増大が見られる。しかし細胞質は特異性を示さないという。**Moore**等によれば一般に腫瘍細胞は造血臓器由来の細胞とは異質の外観を呈し、腫瘍細胞は正常細胞に比して通常遙かに大きく、事実その大きさが重要な基準であるために多分単独で出現した小さな腫瘍細胞は見逃がされる恐れがあるという。標本上の白血球は集取操作、固定及び染色の結果に基づく変化の対照として用いることを指摘している。次に重要なのは形態と染色性であり核の未熟性、核小体の肥大、分裂像及び核異常により鑑別出来るという。

以上2, 3の研究者の流血中腫瘍細胞判定に関する見解を述べてみたが腫瘍細胞は大型であり、核優勢を示めし、核小体の肥大、クロマチン含量の増加及びその配分の不均等といった判定基準を共通にあげているが、これは私が尿路悪性腫瘍について腫瘍直接塗抹標本を作成し **Papanicolaou** の悪性判定の総括的基準に照らし項目別に検討して得た結果と良く一致している。

結 論

組織学的に証明された尿路悪性腫瘍患者7例について腫瘍組織直接塗抹標本を作成し **Papanicolaou** の悪性判定基準に照らし無差別的に個々の細胞を検討したところ総括的基準の全項目を満たす細胞は極めて少く、大多数の細胞は核の変化8項目中4~6項目を満し、細胞質内の変化及び細胞全体としての変化6項目中2~4項目を満す細胞が多い。

観察細胞の大部分に1)核・細胞質比の増大を伴う不均衡な核の肥大(裸核細胞を除き100%),2)クロマチン含量の増加(73~100%),3)クロマチン配分の不均等(75~100%),4)核小体の肥大・増加(51~94%),5)巨大化(91~100%)が認められた。

以上より悪性細胞の疑いのある細胞に遭遇した際は **Papanicolaou** の悪性判定基準に照らし核の変化8項目中5項目、細胞内及び細胞全体としての変化で6項目中3項目程度を満し、且つ該当項目が上述した5項目に合致するときは観察細胞が悪性細胞である可能性が濃厚であると考えられる。(文献は第4編に一括記載した)