胃癌細胞診計量化に関する基礎的研究

A Fundamental Study of Quantitative
Cytology in Gastric Cancer Cells

藤 井 佑 二*

YUJI FUJII, M.D.

胃癌の細胞診は、その細胞採取法の変遷と共に進歩してきたが、細胞採取法が確立した現在、診断学の不遍化が要求されてきた。しかしながら、現在のところ細胞診は診断基準としての悪性指標があるにもかかわらず、検者の主観に基づいて判定されている状態である。診断に客観性を求めるためには、判定基準を客観的に評価することが必要であり、そこに細胞診の計量化の要求が生じた。一方、細胞診の普及に伴う検体の増加に従って、細胞診の自動化が重要な問題として取り上げられ、ここにも細胞診の計量化の必要性が生じた。

そこで胃癌細胞診の計量化に関する基礎的研究を目的として次の研究を行なった。顕微分光光度計を用いてスキャンニング法を応用し、核径、クロマチン量、クロマチンパターンの三つをパラメーターとして、明らかに良性細胞である Class I の細胞160個と、明らかに悪性細胞である Class V の細胞160個計320個につき計測し、それぞれのパラメーターが細胞診の計量化のパラメーターとして適正であるか、どうかにつき検討した。

その結果三つのパラメーターによる成績はそれぞれ非常に高い診断率を表わし、それぞれが優秀なパラメーターであることを示した。一つのパラメーターで誤診した例でも、二つのパラメーターで重複して誤診した例は少なく、320個中1個のみが重複誤診した。しかし、三つのパラメーターが全部で重複誤診した例は認められなかった。そのことから三つのパラメーターはそれぞれ独自の意味を持ち、核径、クロマチン量、クロマチンパターンともに必要不可欠のものであることを証明した。

胃癌の治療成績を向上させるためには、胃癌を如何に早期に発見するかどうか、即ち、早期診断が最も大切である。この胃癌の早期診断にはX線検査、内視鏡検査と共に細胞診が大きな役割を果たしてきた。特に細胞診は、組織診と同様に最終的な決定診断能を持っていることが重要な意味を持っている。

胃癌の細胞学的診断法の歴史は、1882年に Rosensbach¹⁾ が、胃洗浄液より腫瘍細胞を認め、胃癌の診断に対する細胞診の有用性を提唱したこと

を嚆矢とする。ついで Papanicolaou²⁾ が1943年に、現在の細胞診の基礎となる子宮癌の細胞診断法を報告、これにより、細胞診は診断学として一段と進歩した。さらに1948年に Graham³⁾ が胃液の吸引により、胃癌の細胞診において高い診断率を示した。これにより診断学としての胃癌の細胞診の有効性が証明された。本邦では胃液採取法による細胞診が1949年に綾部⁴⁾ らにより、ついで1952年津田⁵⁾ により報告された。また、1950年に Panico, および PaPanicolaou⁶⁾ が、abrasive balloon 法を報告、本邦では、1956年に黒川⁷⁾、福田⁸⁾ が報告している。1951年 Rosenthal⁹⁾ が、蛋白融解酵素である Papain 液を用いて胃洗浄法

* 順天堂大学医学部助手 (外科学教室・消化器)
Department of Surgery, Juntendo University,
School of Medicine,
(Sept. 3, 1977 受付)

を行なった。1952年には Hennig¹⁰⁾ が ZelltuPfs-sonde 法を報告した。1953年 Rubin¹¹⁾ が、本邦では1959年山田¹²⁾ がキモトリプシンによる胃洗浄法を報告している。また、1953年 Ayre¹³⁾ が Gastric brush 法を発表している。1960年信田¹⁴⁾ は、軟性胃鏡下に鋭匙による細胞搔取法を発表した。さらに、1958年 Hirschowitz¹⁵⁾ によるファイバーストロスコブが開発され、その発達に従って1964年春日井¹⁶⁾ は、ファイバーストロスコブに胃ゾンデを附着させ、内視鏡観察下に胃の洗浄細胞診を行ない、その成果を発表した。1967年赤木¹⁷⁾、城所¹⁸⁾ らにより、生検塗抹法による細胞診が行なわれ、1968年には、城所¹⁹⁾ らにより内視鏡下の直接吸引細胞診が報告されている。近年、細胞診において生検組織の塗抹による細胞採取法が最も優れた方法として、広く行なわれる様になり、それに伴って細胞診は診断学として一応の完成をみた。しかしながら、その形態学的診断は、悪性指標としての判定基準があるにもかかわらず、検者の主観に基づいて判定が行なわれているのが現状である。診断に客観性を求めるためには、判定規準を客観的に評価することが必要である。そこに細胞診の計量化の絶対的 要求が生じた。一方、細胞診の普及による検体の増加に伴って、細胞診の自動化が重要な問題として取り上げられ、ここにも細胞診の計量化の必要性が発生してきた。細胞診の計量化については、1924年 Feulgen と Rossenbeck²⁰⁾ が、DNA の特異的染色に成功して以来、注目されてきた。1936年 Caspersson²¹⁾ が、その紫外線顕微分光法を行なった。1959年 Atkin²²⁾ が、子宮頸癌細胞の核 DNA 量は正常細胞のそれと比較して明らかに増加していると報告した。それ以後、顕微分光光度計を用いて核 DNA 量の定量を行なった報告は数多い。それより少し前の1956年に、Bertalanffy²³⁾ により acridine orange 染色法による DNA, RNA に対する蛍光特異性が確認された。さらに Wied²⁴⁾、Rigler²⁵⁾ らは、DNA が 530m μ の極大蛍光を放つことに注目し、顕微分光光度計を用いて、これを細胞診の自動化の応用に試みた。1959年、Bostro-

m²⁶⁾ らにより Cytoanalyzer が開発されて以来、種々の方法で自動化のアプローチが試みられてきた。1963年以来、flying spot による走査法が顕微分光光度計に併用され、電子計算機によって処理を行なう装置に発展した。さらに、多くの研究者により顕微分光光度計による種々の自動化の報告がなされてきた。その他に、テレビカメラとコンピュータの併用による画像分析法、cytoflow system 法、蛍光抗体法などがある。しかしながら、細胞診の自動化はもとより、計量化についても未だ十分に満足出来る報告はなされていない。そこで著者は、胃癌細胞診の計量化に関する基礎的研究の一環として顕微分光光度計を用いてスキャンニング法を応用し、核径、クロマチン量、クロマチンパターンを計測し、これらが胃癌細胞診の計量化のパラメーターになり得るかどうか検討した。

研究対象

1. 研究材料の採取

昭和51年2月27日より昭和52年4月8日までの約1年2カ月間に、当院消化器外科に入院した患者、または外来に通院した患者で胃内視鏡検査を受けた患者601例中20例を研究対象に選び、その胃生検材料より塗抹標本を作成した。20例の内訳は、悪性例12例、良性例8例であった。悪性例はすべて胃癌症例であり、進行癌9例（うち Borrmann II型1例、Borrmann III型6例、Borrmann III型6例、Borrmann IV型1例、IIc進行型1例）、および早期癌3例（うち IIc + III型2例、IIa型1例）であった。良性例8例の内訳は胃潰瘍5例、胃線維腫1例および慢性胃炎2例であった。悪性例はすべて手術標本の病理組織学的検索において癌と診断されたものであり、良性例については、手術例は手術標本の病理組織学的検索により、また、非手術例では、生検材料の検索、および臨床経過より良性と判断されたものである。性別では、男性13例、女性7例であった。年齢別では31~40歳2例、41~50歳4例、51~60歳7例、61~70歳6例、および71歳以上1例であった。

2. 研究材料の処理

胃内視鏡検査時に採取した胃生検材料を、顕微分光測光用の規定のプレパラートに塗抹し、95%のエチルエーテル、エチルアルコール等量混合液にて15~60分間固定した。これに図1のごとくPapanicolaou染色を施し、封入剤MGKを使用して封入を行なった。

-
- (A) 95% Ether, Ethanol 等量混合液に湿固定
15~60分間
(B) 固定液バットから乾かさずに、95%→
80%→70%→50%とalcohol系列を下げ→
蒸留水
(C) Harris氏 Hematoxylin で核染色、1~2分間
(D) 流水で洗う
(E) 0.25%塩酢水で分別
(F) 色出し、流水で静かに5分
(G) 蒸留水→50%→70%→80%→95%
Ethanol
(H) OG-6 で 1.5~2分間
(I) 95%→95%→95% Ethanol
(J) EA-50 で 2.5~3分間
(K) 95%→95%→95%→100%→100%
Ethanol→Xylane→Xylane→Xylane
(M) 封入
-

図1 Papanicolaou 染色法

3. 研究材料の選出

Papanicolaou染色を施した胃生検塗抹標本に、まず通常の光学顕微鏡を用いてルーチンの検鏡を行なった。標本の染色性、細胞の変性の有無など、標本の良、不良をチェックし、不良標本は除外した。適当な標本について孤立した細胞を選び、明らかに良性と診断出来た細胞 class I 160個と、明らかに悪性と診断出来た細胞 class V 160個計320個の細胞を検索の対象とした。

研究 方 法

1. パラメーターの選出

顕微分光光度計を用いた細胞診の計量化のパラメーターとして、従来、核径、クロマチン量が主に用いられており、クロマチンパターンをパラメーターとして使用した報告は少ない。しかし、光顕細胞診においては核所見として、核径、クロ

マチン量と共に、クロマチンパターンが重要な指標になっており、著者はこの点に注目して、スキヤニング法によって描出した吸光度曲線の波型の分類によりクロマチンパターンを分析し、核径、クロマチン量と共に、クロマチンパターンをパラメーターとして選出した。

2. 記録および計測

光学顕微鏡で選出した細胞を、オリンパス製DMSP II型顕微分光光度計(図2)を用いて、

図2

1,000倍の倍率で検鏡、次いで計測する細胞をアサヒペンタックスSL型カメラにて絞りを全開にし、シャッタースピード1/2秒で写真撮影を行なった。

つぎに1μのピンホールを用い、538mμの波長で核のスキヤニングを行なった。スキヤニングの範囲は、X軸は25μで一定とし、Y軸は25μ以内で核径に合わせ調節した。記録計のペーパーの送り速度は200mm/分とした。スキヤニングする波長の決定にはPapanicolaou染色を行なった胃生検塗抹細胞の中で、明らかに良性細胞であるclass I、および明らかに悪性細胞であるclass Vの細胞の核を、各々10個ずつ選出し、370mμ~660mμの波長を自動的、連続的に変動させ、吸光

図 3 Pap. 染色における波長と核の吸光度との関係

図 4 核の Scanning

クロマチン量 $S=S_1+S_2+S_4+S_5+S_6+S_7+S_8+S_9+S_{10}$
(相対量) 核吸光度波形の面積で表わしたものである
($1 \text{ cm}^2=1 \text{ 単位}$)

度曲線を描き、その平均最大吸光度である $538 \text{ m}\mu$ を選出し決定した。(図 3)

1) 核径の計測

核径の計測はマイクロメーターで X 軸と Y 軸につき計測し、長径の方をパラメーターに採用した。

2) クロマチン量の計測

図 5 波型の分類

A 型		単峰性のみ	
B 型	B ₁	2峰性1個 + 単峰性	
	B ₂	2峰性2個 + 単峰性	
	B ₃	2峰性3個以上 + 単峰性	
C 型	C ₁	3峰性 + 単峰性	
	C ₂	(3+2+単峰性)	
D 型	D ₁	4峰性↑ + 単峰性	
	D ₂	(4↑+2+単峰性)	
	D ₃	(4↑+3+2+単峰性)	

表 1 波形の分類

核のスキニングにより描出された吸光度曲線の面積をプランメーターを使って測定した。プランメーターを用いて測定した吸光曲線の総面積は吸光度の総和と比例するものであり、また、それはクロマチン量とも比例するものである。したがって、その吸光度・曲線の面積をもって相対的

クロマチン量とした。記録計のペーパー送り速度 200mm/分の時に描出された吸光度曲線の面積 1 cm^2 をクロマチン量 1 単位 (以下 u と略記) とした。(図 4)

3) 波型の分類

吸光度曲線により描出された波型を分類し、クロマチンパターンを分析した。

1 個の核のスキヤニングで描出された吸光度曲線の個々の波型を、図 5 のごとく分類した。

すなわち、単峰性、2 峰性、3 峰性、および 4 峰性 (含、4 峰性以上) に分け、さらに核のスキヤニングにおいて出現する吸光度曲線の波型の組み合わせを、表 1 のごとく分類した。A 型は単峰性のみ、B 型は 2 峰性 (+) のもので、2 峰性の波数によりさらに B_1 より B_3 型まで分け、C 型は 3 峰性 (+) のもので、 C_1 型と C_2 型に分け、D 型は、4 峰性以上 (+) のもので、 D_1 型、 D_2 型、 D_3 型に分類した。

成 績

1. 核径計測の成績

核径の計測結果をみると、表 2 のごとく、悪性細胞では 160 個全例 11μ 以上を示し、 $11\sim 15\mu$ が 160 個中 79 個 (49.4%)、 $16\sim 20\mu$ が、160 個中 78 個 (48.8%)、 $21\sim 25\mu$ は 160 個中 3 個 (1.8%) であった。一方、良性細胞では全例 15μ 以下であり、特に 10μ 以下のものが 160 個中 153 個 (95.6%) と大半を占めた。他方、 $11\sim 15\mu$ のものは 160 個中 7

悪性細胞	核長径	良性細胞
0	10μ 以下	153 (95.6%)
79 (49.4%)	$11\sim 15\mu$	7 (4.4%)
78 (48.8%)	$16\sim 20\mu$	0
3 (1.8%)	$21\sim 25\mu$	0
160 個	合 計	160 個

表 2 核径の計測の成績

個 (4.4%) に認められたに過ぎなかった。

2. クロマチン量計測の成績

相対的クロマチン量の計測の結果は、表 3 に示

細胞 クロマチン量	悪性細胞	良性細胞
10u 以下	0	1 (0.6%)
11~20u	0	44 (27.5%)
21~30u	0	80 (50.0%)
31~40u	3 (1.9%)	34 (21.3%)
41~50u	9 (5.6%)	1 (0.6%)
51~60u	19 (11.9%)	0
61~70u	19 (11.9%)	0
71~80u	23 (14.4%)	0
81u 以上	87 (54.3%)	0
合 計	160 個	160 個

表 3 核クロマチン量計測の成績

すごとくで、悪性細胞ではクロマチン量 $31\sim 40u$ が、160 個中 3 個 (1.9%)、 $41\sim 50u$ が 160 個中 9 個 (5.6%)、 $51\sim 60u$ が 160 個中 19 個 (11.9%)、 $61\sim 70u$ が 160 個中 19 個 (11.9%)、 $71\sim 80u$ が 160 個中 23 個 (14.4%)、 $81u$ 以上が 160 個中 87 個 (54.3%) であった。良性細胞では $10u$ 以下が 160 個中 1 個 (0.6%)、 $11\sim 20u$ が 160 個中 44 個 (27.5%)、 $21\sim 30u$ が 160 個中 80 個 (50.0%)、 $31\sim 40u$ が 160 個中 34 個 (21.3%)、 $41\sim 50u$ が 160 個中 1 個 (0.6%) であった。

3. 波型分類の成績

波型分類の成績は、表 4, 5, 6 に示すごとくで、悪性細胞では A 型は 1 個もなく、B 型は 160 個中 37 個 (23.2%)、うち B_1 型は 37 個中 1 個もなく、 B_2 型は 37 個中 2 個、 B_3 型は 37 個中 35 個であり、さ

細胞 波 型	悪性細胞	良性細胞
A 型 単峰性のみ	0	110 (68.8%)
B 型 2 峰性+単峰性	37 (23.2%)	49 (30.6%)
C 型 3 峰性が 1 個以上出現するもの	85 (53.1%)	1 (0.6%)
D 型 4 峰性以上が 1 個以上出現するもの	38 (23.7%)	0
合 計	160 個	160 個

表 4 波型分類の成績

細胞		悪性細胞	良性細胞
波型			
A型		0	110 (68.8%)
B型	B ₁	0	25 (15.6%)
	B ₂	2 (1.3%)	21 (13.1%)
	B ₃	35 (21.9%)	3 (1.9%)
C型	C ₁	0	1 (0.6%)
	C ₂	85 (53.1%)	0
D型	D ₁	0	0
	D ₂	5 (3.1%)	0
	D ₃	33 (20.6%)	0
合 計		160 個	160 個

表 5 波型分類の成績

細胞				悪 性 細胞	良 性 細胞
波型					
A型	単峰性のみ			0	110 (68.8%)
B型	2 峰性 (+単峰性)	B ₁	1 個	0	25 (15.6%)
		B ₂	2 個	2 (1.3%)	21 (13.1%)
		B ₃	3 個	35 (21.9%)	3 (1.9%)
C型	3 峰性が 1 個以上 出現するもの			85 (53.1%)	1 (0.6%)
D型	4 峰性以上が 1 個 以上出現するもの			38 (23.7%)	0
合 計				160 個	160 個

表 6 波型分類の成績

らにC型は160個中85個(53.1%)で、うちC₁型は85個中1個もなく、C₂型は85個中85個、また、D型は160個中38個(23.8%)で、うちD₁型は38個中1個もなく、D₂型は38個中5個、D₃型は38個中33個であった。

良性細胞ではA型が多く、160個中110個(68.8%)、B型は160個中49個(30.5%)で、うちB₁型は49個中25個、B₂型は49個中21個、B₃型は49個中3個であり、C型は160個中1個(0.6%)でC₁型であり、D型は1個も見られなかった。

悪性細胞	核 長 径	良性細胞
0	10 μ 以下	153 (95.6%)
79 (49.4%)	11~15 μ	7 (4.4%)
78 (48.8%)	16~20 μ	0
3 (1.8%)	21~25 μ	0
160 個	合 計	160 個

表 7 核径の計測の成績
(良悪性の境界線の設定)

4. 小括

1) 核径による細胞の良性・悪性の判定

表7に示すごとくで、悪性細胞では、核径が10 μ 以下のものは160個中1個もなく全例が11 μ 以上であり、11~15 μ が160個中79個(49.4%)、16~20 μ が160個中78個(48.8%)、21~25 μ が160個中3個(1.8%)で、悪性細胞では11 μ で境界線が引けた。

良性細胞では、11 μ 以上は160個中7個(4.4%)で、10 μ 以下が160個中153個(95.6%)と大半を占め、やはり11 μ で境界線が引けた。すなわち、良性、悪性細胞ともに11 μ で境界線を引くことが出来た。核径11 μ 以上を悪性とするれば、偽陽性は160個中7個(4.4%)であり、偽陰性は皆無であった。全体として正診は320個中313個(97.8%)、誤診は320個中7個(2.2%)であった。

2) クロマチン量による細胞の良性・悪性の判定

細胞	悪性細胞	良性細胞
クロマチン量		
10u 以下	0	1 (0.6%)
11~20u	0	44 (27.5%)
21~30u	0	80 (50.0%)
31~40u	3 (1.9%)	34 (21.3%)
41~50u	9 (5.6%)	1 (0.6%)
51~60u	19 (11.9%)	0
61~70u	19 (11.9%)	0
71~80u	23 (14.4%)	0
81u 以上	87 (54.3%)	0
合 計	160 個	160 個

表 8 クロマチン量計測の成績
(良・悪性の境界線の設定)

表 8 に示すごとく、悪性細胞ではクロマチン量 31~40u が 160 個中 3 個 (1.9%), 41~50u が 160 個中 9 個 (5.6%), 51~60u が 160 個中 19 個 (11.9%), 61~70u が 160 個中 19 個 (11.9%), 71~80u が 160 個中 23 個 (14.4%), 81u 以上が 160 個中 86 個 (54.3%) であった。すなわち 41u で境界線を引くと、41u 以上は 160 個中 157 個 (98.1%), 40u 以下は 160 個中 3 個 (1.9%) であった。

良性細胞では、10 μ 以下が 160 個中 1 個 (0.6%), 11~20u が 160 個中 44 個 (27.5%), 21~30u が 160 個中 80 個 (50.0%), 31~40u が 160 個中 34 個 (21.3%), 41~50u が 160 個中 1 個 (0.6%), 51u 以上は 1 個もなく、良性の場合もクロマチン量 41u で境界線を引くと、160 個中 1 個 (0.6%) のみ 41u 以上となり、160 個中 159 個 (99.4%) は 40u 以下となった。

以上の結果より、良性、悪性とも 41u で境界線を引くことが出来、この判定基準によって判定すると、偽陽性 160 個中 1 個、偽陰性 160 個中 3 個 (1.9%) となった。以上の結果全体としては正診は 320 個中 316 個 (98.7%), 誤診は 320 個中 4 個 (1.3%) であった。

3) 波型の分類を用いたクロマチンパターンの分析による細胞の良性、悪性の判定

表 9 に示すごとく、悪性細胞では、A 型は 160

細胞				悪性細胞	良性細胞
波型					
A型	単峰性のみ			0	110 (68.8%)
B型	2峰性 (+単峰性)	B ₁	1個	0	25 (15.6%)
		B ₂	2個	2 (1.3%)	21 (13.1%)
		B ₃	3個以上	35 (21.9%)	3 (1.9%)
C型	3峰性が1個以上出現するもの			85 (53.1%)	1 (0.6%)
D型	4峰性以上が1個以上出現するもの			38 (23.7%)	0
合 計				160 個	160 個

表 9 波型分類によるクロマチンパターンの分析
(良・悪性の境界線の設定)

個中 1 個もなく、B 型は 160 個中 37 個 (23.2%) で、うち B₁ 型は 37 個中 1 個もなく、B₂ 型は 37 個中 2 個、B₃ 型は 37 個中 35 個で、C 型は 160 個中 85 個 (53.1%), うち C₁ 型は 85 個中 1 個もなく、C₂ 型は 85 個中 85 個、D 型は 160 個中 38 個 (23.7%), うち D₁ 型は 38 個中 1 個もなく、D₂ 型は 38 個中 5 個、D₃ 型は 38 個中 33 個であり、3 峰性以上が (+) の C 型、D 型は 160 個中 123 個 (76.8%) で、さらに B₃ 型 35 個を加えると、160 個中 158 個 (98.7%) となる。ゆえに B₃ 型および C 型、D 型を悪性パターンとすれば、160 個中 158 個 (98.7%) が悪性に判定された。

良性細胞では、A 型が 160 個中 110 個 (68.8%), B 型が 160 個中 49 個 (30.6%) で、うち B₁ 型は 49 個中 25 個、B₂ 型は 49 個中 21 個、B₃ 型は 49 個中 3 個であり、C 型は 160 個中 1 個 (0.6%) で C₁ 型であり、C₂ 型は見られず、D 型は 160 個中 1 個も見られなかった。C 型、D 型を示すものは悪性とする、160 個中 1 個 (0.6%) のみが誤って悪性に入り、さらに少数の B₃ 型 3 個も悪性領域とすれば、160 個中 4 個 (2.5%) が誤って悪性領域に判定された。しかも、悪性細胞に B₃ 型の波型を示すものが多数認められることから、B₃ 型、C 型、D 型のいずれかを示すものが悪性パターンとして分析された。

その結果、偽陽性 160 個中 4 個 (2.5%), 偽陰性 160 個中 2 個 (1.3%) となった。全体から見ると正診は 320 個中 314 個 (98.1%), 誤診は 320 個中 6 個 (1.9%) であった。

4) 誤診例の検討

それぞれのパラメーターに著者が設定した診断基準を当てはめて細胞の良性、悪性の判定を行ない、その成績から、誤診例を検討した。

核径をパラメーターとし、核径 11 μ 以上を悪性細胞判定基準に設定すると、悪性細胞は 160 個中全例悪性に判定されたが、良性細胞では 160 個中 7 個 (4.4%) が核径 11 μ 以上で誤診例となった。ゆえに、全体では 320 個中 7 個 (2.2%) が誤診例となった。(表 10)

次に、クロマチン量 41u 以上を悪性細胞判定

パラメーター 症例	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	11×9	25	単峰性	A型
2	11×8	26	単峰性	A型
3	9×13	20	単峰性	A型
4	11×9	33	(3+単)峰性	C ₁ 型
5	7×11	20	単峰性	A型
6	11×8	24	(2+単)峰性	B ₂ 型
7	11×8	31	単峰性	A型

表 10 計量的診断による誤診例の検討

(その 1……核径)

〔判定基準〕 核径10 μ 以下を良性, 11 μ 以上を悪性とする.

偽陰性例 0/160

偽陽性例 7/160 (4.4%)

偽陰性例 3/160 (1.9%)

パラメーター 症例	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	15×14	38	(3+2+単)峰性	C ₂ 型
2	17×13	34	(4+3+2+単)峰性	D ₃ 型
3	13×16	35	(3+2+単)峰性	C ₂ 型

偽陽性例 1/160 (0.6%)

パラメーター 症例	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	8×7	44	単峰性	A型

表 11 計量的診断による誤診例の検討

(その 2……クロマチン量)

〔判定基準〕 クロマチン量40u 以下を良性, 41u 以上を悪性とする.

基準に設定すると, 悪性細胞では, 160 個中 3 個 (1.9%) が 41u 以下で誤診例となり, 良性細胞では 160 個中 1 個 (0.6%) のみが 41u 以上であり, 誤診例となった. ゆえに, クロマチン量 41u 以上を悪性細胞判定基準に採用すれば, 全体として, 320 個中 4 個 (1.3%) が誤診例となった. (表 11)

ついで波型分類によるクロマチンパターンの分析で, B₃型以上を悪性細胞判定基準に設定すると, 悪性細胞では 160 個中 2 個 (1.3%) が誤診例となり, 良性細胞では 160 個中 4 個 (2.5%) が誤

偽陰性例 2/160 (1.3%)

パラメーター 症例	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	13×13	72	(2+単)峰性	B ₂ 型
2	12×13	60	(2+単)峰性	B ₂ 型

偽陽性例 4/160 (2.5%)

パラメーター 症例	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	11×9	33	(3+単)峰性	C ₁ 型
2	8×8	19	(2+単)峰性	B ₃ 型
3	10×10	23	(2+単)峰性	B ₃ 型
4	9×9	23	(2+単)峰性	B ₃ 型

表 12 計量的診断による誤診例の検討

(その 3……波型によるクロマチンパターン)

〔判定基準〕 波型 A, B₁, B₂ 型を良性, B₃, C, D 型を悪性とする.1. 核径 (良性細胞で 11 μ 以上のもの) 7/160 (4.4%)

パラメーター 例数	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	11×9	25	単峰性	A型
2	11×8	26	単峰性	A型
3	9×13	20	単峰性	A型
4	7×11	20	単峰性	A型
5	11×8	24	(2+単)峰性	B ₂ 型
6	11×8	31	単峰性	A型
7	11×9	33	(3+単)峰性	C ₁ 型

2. クロマチン量 (良性細胞で 41u 以上のもの)

1/160 (0.6%)

パラメーター 例数	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	8×7	44	単峰性	A型

3. 波型によるクロマチンパターン

(良性細胞で, A, B₁, B₂ 型のもの) 4/160 (0.6%)

パラメーター 例数	核径 (μ)	クロマチン量 (u)	波	型
1	8×8	19	(2+単)峰性	B ₃ 型
2	10×10	23	(2+単)峰性	B ₃ 型
3	9×9	23	(2+単)峰性	C ₃ 型
4	11×9	33	(3+単)峰性	C ₃ 型

表 13 偽陽性例の検討

(良性細胞であるが, 計量的細胞判定基準では) 悪性と誤診したもの. 計 12/160 (7.5%)

診別となった。(表12)

さらに誤診例を偽陽性例と、偽陰性例に分けて検討してみると、偽陽性例では(表13)、核径で誤診した例は160個中7個(4.4%)で、他の二つのパラメーターのいずれかを加えて検討した場合、重複して誤診したのは160個中1個(0.6%)であった。クロマチン量での偽陽性例は160個中1個で、他の二つのパラメーターでは、いずれも正診であり、偽陽性例は160個中1個もなかった。クロマチンパターンの分析での偽陽性例は160個中4個(2.5%)であったが、他の二つのパラメーターのいずれかを加えてみると、重複して誤診したものは160個中1個(0.6%)のみであった。この症例は核径で誤診した例と同一の症例であり、結局、全体として二つのパラメーターで重複して誤診した偽陽性例は160個中1個(0.6%)のみで、三つのパラメーター全部で誤診した例はなかった。

つぎに偽陰性例についてみると(表14)、核径では160個中1個もなく、クロマチン量では160個中3個(1.9%)が偽陰性例となるが、他の二つのパラメーターのいずれかを加えてみると、重複し

1. 核径(悪性細胞で10 μ 以下のもの)……0/160
2. クロマチン量(悪性細胞で40u以下のもの)……3/160 (1.9%)

パラメーター 例数	核径 (μ)	クロマチン量(u)	波型
1	15×14	38	(3+2+単)峰性 C ₂ 型
2	17×13	34	(4+3+2+単)峰性 D ₃ 型
3	13×16	35	(3+2+単)峰性 C ₂ 型

3. 波型(悪性細胞でA型, B₁型B₂型のもの)……2/160 (1.3%)

パラメーター 例数	核径 (μ)	クロマチン量(u)	波型
1	13×13	72	(2+単)峰性 B ₂ 型
2	12×13	60	(2+単)峰性 B ₂ 型

表 14 偽陰性例の検討
(悪性細胞であるが計量的細胞判定準では)
(良性と誤診したもの. 計 5/160 (3.1%))

て誤診するものは160個中1個もなかった。クロマチンパターンの分析でみると、偽陰性例は160個中2個(1.3%)であるが、他の二つのパラメーターのいずれかを加えてみると、重複して誤診するものは160個中1個もなかった。結局、全体として二つのパラメーターで重複して誤診した偽陰性例は160個中1個もなかった。

以上のごとく、三つのパラメーターを使って診断すると、偽陽性例、偽陰性例は、1個もなかった。このことは、三つのパラメーターが個々に独自の意味を持ち、それぞれが必要不可欠なパラメーターであることを示していると同時に、一つ一つのパラメーターに設定した診断基準が妥当なものであることを証明した。特に判定基準からみて、偽陽性率に比べて、偽陰性率が低いことは臨床上高い信頼性を示すものである。

考 案

1943年 Papanicolaou, および Traut²⁾ により、子宮癌の細胞学的診断法が発表され、さらにこの方法が胃癌の診断に応用されると、顕微鏡レベルでの診断法であることが、従来の肉眼レベルに頼る診断方法に比べて臨床医家に格別の信頼感を与えた。

1. (細胞採取法)

細胞診の進歩は細胞採取法の変遷にあり、その細胞採取法は初期には空腹時胃液吸引法²⁷⁾²⁸⁾³⁷⁾⁴⁾が行なわれた。その時代は、胃液による細胞変性などが原因で良好な診断成績が得られなかった。ついで、胃内腔を洗浄することによって、出来るだけ変性の少ない新鮮な細胞を剝離させようとする試みが生理的食塩水洗浄法³⁰⁾³¹⁾によって行なわれ、さらに、Papain, Chymotrypsin などの蛋白融解酵素液を用いて細胞の剝離性を高め、癌細胞を採取しようとする蛋白融解酵素洗浄法⁹⁾³²⁾¹¹⁾¹²⁾³³⁾が行なわれた。ほぼ、同時期に胃内腔を物理的に擦過して、癌細胞が胃内壁に露出している部分から、直接その細胞を採取しようとする Abrasive balloon 法³⁾, Gastric brush 法¹³⁾, ZelltuPfonde 法¹⁰⁾などの装置が考案されて、次

第に高率の癌細胞陽性率が得られるようになってきた。しかし、これらが盲目的採取法であったのに対して、胃鏡の発達に助けられて胃内視鏡観察下に病巣部から細胞を採取しようとする方法³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾¹⁴⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾が試みられた。しかしながら、これらの方法も未だ十分なものでなかった。1958年 Hirschowitz¹⁵⁾が、ファイバーストスコープを開発し、内視鏡検査が一段と発達するに及び、内視鏡観察下に行なう洗浄細胞診⁴⁰⁾⁴¹⁾、擦過細胞診⁴²⁾⁴³⁾、および吸引細胞診⁴⁹⁾等が行なわれてきた。1967年赤木¹⁷⁾、城所¹⁸⁾らにより生検塗抹法が報告されて以来、細胞の新鮮性、胃液およびオートアナライズによる細胞変性の少なさ、細胞極在性等の点から、生検塗抹法が最も優れた細胞採取法とされて広く用いられてきた。著者もこの理論に従って、生検塗抹法による細胞採取法を採用した。

2. (細胞処理法)

日常細胞診に用いられている染色法としては、Giemsa 法と Papanicolaou 法がある。その他、Feulgen 法、Acridine-Orange 法などを使用した方法もあるが、これはいまだ診断法としては確立されていない。Giemsa 法は乾燥固定のために、即時固定の Papanicolaou 法に比較して細胞変性が大きく、現段階では計量化には適当でないと考える。さらにクロマチンパターンの判別にも、後者の方が優れているとされている。

従って、著者は現在最も広く行なわれており、簡単性、再現性という点でも、計量化を行なう上で優れている Papanicolaou 染色法を用いて本研究を行なった。

3. (細胞の選別)

従来より細胞診では、個々の細胞の所見と共に、細胞群としての所見を細胞の良悪性の判定基準として重視してきた。いわば、細胞組織診のごとき部分がかった。しかし、純粋な細胞学的立場からみると、細胞群としての所見がなくとも、個々の細胞について正確な判定がなされる事が望ましい。細胞群の所見をより重要視する事は、個々の細胞の所見をとらえて診断するという正しい細胞学に基づく診断の発展を妨げるものであり、著

者は、個々の細胞について詳細に検討する方法を採用した。しかも、細胞診を計量化するに当たってパラメーターの単純化、簡素化の必要があって孤立した細胞を選んで計測した。さらに、細胞の集合や、重積によるパラメーターの複雑化は計測値の判定を煩雑化するのみで、細胞診の計量化の上ではなんら利点はないものとする。

4. (計量化の方法)

細胞診の計量化の方法としては、二つに大別される。その一つは、従来の光顕の細胞診のレベルの中でパラメーターを選出し、統計学、または推計学などにより計量的に取り扱う方法で、もう一つは、顕微分光光度計や、テレビコンピュータを用いて細胞像を分析し、その中からパラメーターを選出し計量化を行なう方法である。前者としては、Ledley、および Lusted⁴⁴⁾ が Bayes の定理を用いて報告した計量的細胞診断法があげられる。さらに本邦でも、各分野で計量診断学の重要性が報告されている^{45)~54)}。福田⁵⁵⁾ は胃癌細胞診の判定に尤度法を用いて 89.2%の診断率を得ている。菅田⁵⁶⁾ は、従来から悪性細胞の判定基準として挙げられている細胞所見を統計学的に吟味し、そのうち12項目の細胞所見を用いて判別函数法、尤度法による細胞判定を行ない、誤診率はそれぞれ3.3%、2.1%であったと報告している。しかしこれらは、全て細胞一つ一つを診断の対象とせず細胞群を対象とした推計学的診断法である。

さて、後者の機械を用いてパラメーターを選出した計量化の方法には、大きく分けて三つの方法がある。第一は顕微分光測光法を応用した方法で、第二は Cytoflow system 法で第三は蛍光抗体法である。

顕微分光測光法を応用した方法には、機械装置により分けると、顕微分光光度計のみを用いる方法、テレビカメラとコンピュータを組み合わせた方法、集束ファイバーを用いた方法に分けられる。

また、それに使用する標本の染色方法により分けると、核 DNA を染める Feulgen 染色法や、Acridine-Orange 染色法、さらに核 DNA、およ

び RNA を染めるガロシアニン染色法、核蛋白ヒストンを染める Hematoxylin 法, Papanicolaou 法などがあり、そのほかには Giemsa 法がある。また、計測方法に Spot 法と、Scanning 法とがあり、光学的な正確度から言えば Scanning 法が優れている。しかし、Spot 法に比べると計測時間がかかるため、細胞診の計量化には優れているが、自動化に用いる場合はやや問題がある。今回、著者は計量化の基礎的研究を行なう目的で、パラメーターの正確性を考慮し Scanning 法を用いた。

顕微分光光度計を用いた方法では、核 DNA の定量についての報告は多く、Feulgen 染色法を用いたものでは、Caspersson⁵⁷⁾ 以来、直良⁵⁸⁾、Ris⁵⁹⁾、Leuchtenberger⁶⁰⁾ などによりその確実性が実証され、本邦においても御園生、安里⁶¹⁾、野嶽、後藤⁶²⁾、和泉⁶³⁾、岸上⁶⁴⁾ などが、子宮頸部細胞および組織について核 DNA の定量的研究を行っている。Acridine-Orange 染色法によるものとしては、Wied²⁴⁾、Rigler²⁵⁾ が応用し、本邦でも田中⁶⁵⁾ の報告がある。さらにガロシアニン染色法での核 DNA、RNA 定量法については、井出⁶⁶⁾ の報告があり、Feulgen 染色に比べて染色が簡単である所から Feulgen 染色に代わるものであると報告している。Hematoxylin 染色法による報告は少ないが、守矢⁶⁷⁾ はそれを用い良い成績をえたと報告している。しかし、通常細胞診のルーチンワークに使用されている Papanicolaou 染色法で計量化を行なった報告は、顕微分光光度計を用いたものでは少ない。顕微分光光度計を用いた方法は、従来 Feulgen 染色法、または、Acridine-Orange 染色法でのみ応用されてきたが、これらの染色法では検査の再現性の点で問題があり、計量化の裏づけが証明されていない。Giemsa 法では、横田⁶⁸⁾ が胃の良性、悪性細胞の顕微測光を行ない、臨床的に応用できると報告している。テレビカメラとコンピュータを組み合わせた方法は、主に Papanicolaou 染色法にて行なわれている。最近の報告では竹口⁶⁹⁾ の報告があるが、Papanicolaou 染色法を用い核径、N/C 比、クロマチン量

をパラメーターとしておこなっている。特殊フィルターを使って細胞の重量や、折れ曲がり、異物の混入を防いでいるが、染色濃度の不均一のため核と細胞質を十分に分離し得ない事や、細胞の折れ曲がり部分が核とみなされたりすることとか、白血球の凝塊が邪魔になったりすることとかで、未だ十分な成績はえられず、かなり改良する余地が残されている。

集束ファイバーを使用し核 DNA 量を計測する方法は、西谷ら⁷⁰⁾ により報告されているが、やはり再現性の点で問題がある。

Cytoflow system 法は1956年 Coulter が、High speed automatic blood cell counter and size analyzer を発表して以来、1965年 Dilla による細胞の大きさの計測、Fulwyler による細胞体積の計測と、flow system の歴史が始まった。これは Laser 光線を用い、蛍光染色をするものと、全く染色をしないものと2種類がテストされているが、一検体を5分間で解析出来、スピードの点からは優れている。しかし、この方法では液状検体である必要性から固定液の問題、ならびに変性の問題がある。また、異物、変性細胞を Positive と読む可能性があり、再現性がない事も重大な欠点とされ、全体としてまだ大きな問題をいろいろ含んでいる。

蛍光抗体法については、未だ方法論のみで実際にはあまり行なわれていない。

5. (波長の決定)

Papanicolaou 染色に使用する色素は5種類で、Hematoxylin, Eosin Y, Light green, Bismark brown, Orange G, である。核に染色性のある色素は Hematoxylin で、大部分はこれにより染まるが、わずかに核小体が Eosin Y で染まるものもある。

純粋な Hematoxylin の最大吸光波長は守矢⁶⁷⁾ によれば、520m μ であると報告されているが、著者は波長の決定を行なうに当たり、Papanicolaou 染色を行なった胃生検塗抹細胞の中から、明らかに良性細胞と診断される Class I と、明らかに悪性細胞と診断される Class V の細胞を各々10個

ずつ選出し、370 μ ~660 μ の波長を自動的に連続的に変動させ、その吸光度曲線を描き、平均最大吸光度538 μ を選んだ。実際面において、Papanicolaou 染色を施した標本を Scanning する場合、純粋な Hematoxylin の最大吸光波長を使用するのと比較して、実験的最大吸光波長を使用する方が適正であると考ええる。

6. (パラメーターの選出)

顕微分光光度計を用いた研究では、計量化のパラメーターとして、核径、クロマチン量または核量の両方、(または、核 DNA 量)の両方または、いずれか一方を用いたものがほとんどであり、クロマチンパターンをパラメーターに取り入れた報告は少ない。しかし、通常の細胞診では、今だクロマチンパターンは重要な判定のパラメーターであり、著者は核のスキヤニングによる吸光度曲線の波型を分類する事により、クロマチンパターンを分析し、核径、クロマチン量と共に計量化のパラメーターの一つとしてこれを使用し、その判定成績の優れている事と、パラメーターとしての独立性からその必要性を証明した。

7. (成績の比較)

a. <核径>

山形⁷¹⁾らによれば、20 μ 以上の核径は癌に最も高頻度に見られるとしているが、慢性胃炎などにも認められるとし、木村⁷²⁾のデータによれば、20 μ 以上は潰瘍に少数認められることがあるが、多くは癌細胞であると述べ、西川⁷³⁾は、20 μ 以上はほとんど癌のみであるとしている。春日井⁷⁴⁾らは、進行癌細胞の27.4%が20 μ 以上の核径を有すといひ、同じく松原⁷⁵⁾は、進行癌細胞の26%は20 μ 以上の核径を持つといひ、また、早川⁷⁶⁾らは、核径が20 μ 以上の癌細胞が癌細胞全体の41.5%に達すると述べ、菅田⁵⁶⁾は癌細胞の20.7%に20 μ 以上核の径の細胞が見られるが、非癌にはないと述べている。谷合⁷⁷⁾は、癌細胞の55%が21 μ 以上の核径を有すと述べており、山岸⁷⁸⁾らは、癌患者の標本中76.3%の比率で20 μ 以上の核径を有する細胞が認められると報告している。

以上、諸家の報告をまとめてみると、核径が

20 μ 以上の癌細胞の占める比率は、かなり差があるようで、20 μ 以上の核径を有する細胞が出現した場合、癌が強く疑がわれるという事のようなのである。しかしながら、癌と非癌の細胞における核径の境界を明示した報告はない。

著者の成績では、明らかに良性と認められた細胞の核径は全例15 μ 以下であり、特に核径10 μ 以下の細胞が160個中153個を占め、11 μ 以上の核径を占めるものはわずか7個に過ぎなかった。一方、明らかに悪性と認められる細胞における核径は、いずれも11 μ 以上であり、核径をパラメーターとした場合、10 μ と11 μ の間で良性、悪性の境界を引く事が出来た。

b. <クロマチン量>

Feulgen 染色を用いて核 DNA 量を測定した報告は、ほとんどが婦人科領域で行なわれており、消化器領域では、わずかに三戸が胃癌、胃潰瘍、健常胃上皮の生検塗抹標本を顕微分光計により測定し、その測定値から診断基準を発表したに過ぎない。一方、著者はクロマチン量を、吸光度曲線をプランニメーターを使って積分し、算出された面積の1 cm^2 をクロマチン量1単位として計測して、41単位を良、悪性の判定基準の境界線として選んだ。本法では正診率98.7%および誤診率1.3%の成績を得た。従って、クロマチン量をパラメーターとする方法は、細胞診の良、悪性の境界を明確に判読するために有力な方法であり、細胞診の計量化に果たす役割は大なるものである。

c. <クロマチンパターン>

従来、癌細胞においては、クロマチン量の増加と、クロマチンパターンの粗糙化が特徴であるとされてきたが、最近これらの形態学的特徴について多少の異論^{78)80)~83)}がある。しかしながら、従来の学説が全面的に否認されたわけではなく、深く信頼性のある情報とされている。

著者は従来多くの研究者がパラメーターとして取り上げなかったクロマチンパターンの分析も細胞診の計量化に必要な不可欠な因子と考え、吸光度曲線の波型を分類し、クロマチンパターンの分析を行なった。さきに表に示したごとく、A型、B₁型、

B₂型の良性パターン群と、B₃型、C型、D型の悪性パターン群とで明らかに良性細胞と悪性細胞の境界の分岐が行なわれる。この分岐に従って細胞の良悪性の判定を行なうと、良性細胞160個中156個が正診であり、正診率、悪性細胞160個中158個が正診であり、正診率98.7%であり、偽陽性2.5%、偽陰性1.3%であり、両者合わせて正診98.1%、誤診1.9%であった。

この結果、クロマチンパターンもパラメーターとして、核径、クロマチン量と同様に優れたものであった。このクロマチンパターンを他のパラメーターと重複して計量すると、クロマチン量とでは誤診はなく、核径との場合のみ1例の偽陽性例が認められた。すなわち、320個中1個(0.3%)の誤診となった。しかし、三つのパラメーター全部で総合的に診断した場合、重複して誤診した症例はなかった。

この事はクロマチンパターンが核径、クロマチン量と共に優れたパラメーターであると共に、パラメーターとして独自の意味を持ち、必要不可欠のものである事を証明した。

結 語

胃癌細胞診の計量化に関する基礎的研究の一環として、顕微分光度計を用い、核径、クロマチン量、クロマチンパターンの三つをパラメーターとして、明らかに良性細胞である Class I の細胞160個と、明らかに悪性細胞である Class V の、細胞160個の計320個につき計測し、それぞれのパラメーターが、細胞診の計量化のパラメーターとして適正であるか、どうかにつき検討した。

1. 三つのパラメーターによる診断率はそれぞれ高い診断率を示し、それぞれが優秀なパラメーターである事を示した。
2. 一つのパラメーターで誤診した例でも、二つのパラメーターで重複して誤診した例は少なく、320個中で1個のみであったが、三つのパラメーターで重複して誤診した例は認めなかった。
3. 以上の結果、三つのパラメーターは、それ

ぞれ独自の意味を持ち、細胞診の計量化のパラメーターとして、核径、クロマチン量、クロマチンパターン共に必要不可欠なものである事を証明した。

4. 従来、多くの研究者が取り上げなかったクロマチンパターンを、著者は新しく細胞診計量化のパラメーターとして採用し、その優秀性と必要性を証明した。
5. これらのパラメーターによる計測値は、客観性、再現性を有しており、その成績は信頼性が認められた。

本法で得られた新知見は、細胞診の計量化の基礎的研究を一步前進させた。

稿を終えるに当たり、ご校閲下さった城所功教授に深く感謝致します。また、特にご指導ご鞭撻を賜った杏林短期大学教授・本学講師の沢田好明博士、本学山崎忠光博士、並びに津田胃腸科医院院長津田靖彦博士に深甚なる謝意を表します。また、教室の協同研究者各位に心より感謝致します。

なお、本論文要旨は第18回日本臨床細胞学会総会(1977年4月)において発表した。

文 献

- 1) Rosenbrch, O : Über die Anwesenheit von Geschwulst Partikeln in dem durch die Magenspumpe entleerten Mageninhalt bei Karzinoma Ventriculi. Dtsch. Med. Wschr., 8 : 452-453, 1882.
- 2) Papanicolaou, G.N., and Traut, H.F. : Diagnosis of Uterine cancer by the vaginal smears. Common Wealth Fund., New York, 1943.
- 3) Graham, R.M. : The cytologic method as an aid in the diagnosis of gastric carcinoma. Surg. Gyne. & Obstet., 86 : 257-259, 1948.
- 4) 綾部正大・太田敏朗 : 塗抹法による胃癌の細胞学的診断法. 最新医学, 5 : 294-298, 1950.
- 5) 津田一彦・川中子止善 : 胃癌診断上参考となる胃液の塗抹所見に就いて. 日消化会誌, 50 : 26-27, 1952.
- 6) Panico, F.G. & Papanicolaou, G.N. : Abrasive balloon for exfoliation of gastric cancer cell. J.A.M.A., 143 : 1308-1311, 1950.

- 7) 黒川利雄ら：胃癌の細胞学的診断。癌の臨床, 2: 274~280, 1956.
- 8) 福田保ら：胃癌の細胞学的診断(Abrasive Balloon) 法, 総合臨床, 6: 1555~1569, 1957.
- 9) Rosenthal, M. & Traut, H.F.: The mucolytic action of papain for cell concentration in the diagnosis of gastric cancer, *Cancer*, 4: 147-149, 1951.
- 10) Henning, N. und Witte, S.: Über eine neue Methode zur Zytodiagnostik der Magenkrankheiten. *Dtsch. med. Wschr.*, 77(I): 1-4, 1952.
- 11) Rubin, C.F. et al: The clinical value of gastrointestinal cytologic diagnosis, *Gastroenterology*, 25: 119-138, 1953.
- 12) 山田喬：蛋白融解酵素洗滌法による胃癌の細胞学的診断に関する研究。日消化会誌, 56: 100~113, 351~375, 1959.
- 13) Ayre, J. E. and Oren, B.G.: A new rapid method for stomach cancer diagnosis: The gastric brush. *Cancer*, 6: 1177-1181, 1953.
- 14) 信田重光：胃癌の細胞学および組織学的診断に関する研究。(特にAbrasive Balloon 法およびGastroscopic Biopsy 法について)。日外会誌, 61: 40~63, 1960.
- 15) Hirschowitz, B.I. & Curtiss, L.E.: Demonstration of a new gastroscope, the "Fiberscope". *Gastroenterology*, 35: 50-53, 1958.
- 16) 春日井達造：ファイバーストスコープによる生検および細胞診。臨床病理, 12: 546~548, 1964. 日外会誌, 61: 40~63, 1963.
- 17) 赤木正信ら：直視下胃生検による胃癌, ことに早期胃癌の診断における酵素化学の応用およびその細胞およびその細胞診への応用の可能性について。胃と腸, 2: 111~116, 1967.
- 18) 城所仿ら：胃直視下細胞診について(直視下洗滌, B型吸引, および生検組織の塗抹細胞診)。Endoscopy, 9: 39, 1967.
- 19) 城所仿ら：直視下診断法(直視下吸引細胞診を中心に)胃と腸, 3: 1201~1210, 1968.
- 20) Feulgen, R. & Rossenbeck, H.: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seylers zeitschrift für physiologische Chemie, 135: 203-248, 1924.
- 21) Caspersson, T.: Über den chemischen Aufbau des Strukturs des Zellkernes. *Scand. Arch. Physiol.*, 73: Suppl. 8: 1-158, 1936.
- 22) Atkin, N.B. and Richards, B.M. and Ross, A.J.: The deoxyribonucleic acid content of carcinoma of the uterus: An assessment of its possible significance in relation to histopathology and clinical course, based on data from 165 cases. *Brit. J. Cancer*, 13: 773-787, 1959.
- 23) von Bertalanffy, L.: Use of acridine-orange fluorescence technique in exfoliative cytology. *Science*, 124: 1024-1025, 1956.
- 24) Wied, G.L., Messina, A.M., Meier, P. and Blough, R.R.: Fluorospectrophotometric analyses on cervical epithelial cells. *Acta. Cytol.*, 8: 61-67, 1964.
- 25) Rigler, R.: Microfluometric characterization of intra cellular nucleic acid and nucleoproteins by acridine orange. *Acta. Physiol. Scand.*, 67: Suppl. 267: 1-122, 1966.
- 26) Bostrom, R.C., Sawyer, H. S., and Tolles, H.E.: Instrumentation for automatically pre-screening cytological smears. *Proceedings of the ire.*, 1895-1900, 1959.
- 27) Papanicolaou, G.N.: Diagnostic value of exfoliated cells from cancerous tissues. *J.A.M.A.*, 131: 373-378, 1946.
- 28) Papanicolaou, G.N. and Cooper, W.A.: The cytology of the gastric fluid in the diagnosis of carcinoma of the stomach. *J. Nat. Cancer Inst.*, 7: 357-360, 1947.
- 29) 津田一彦：胃液の顕微鏡的検査。臨消化病, 1: 393~398, 1953.
- 30) Ulfelder, H., et al: Further study on the cytologic method in the problem of gastric cancer. *Ann. Surg.*, 128: 422-424, 1948.
- 31) 綾部正大ら：胃癌の細胞学的診断法。日消化会誌, 48: 24~25, 1950.
- 32) 湯川永洋ら：消化器癌の細胞学的診断。日本臨床, 14: 1019~1028および1173~1185, 1956.

- 33) 山形敏一：消化管疾患の展望。臨床の日本，7：148～155，1961.
- 34) Kenamore, B.: A biopsy forceps for the flexible gastroscope. Amer. J. Digest. Dis., 7: 539-542, 1940.
- 35) Benedict, E.B.: An operating gastroscope. Gastroenterology, 11: 281-283, 1948.
- 36) Tomenius, J.: A new instrument for gastric biopsies under visual control. Gastroenterology, 21: 544-546, 1952.
- 37) 常岡健二：胃鏡検査法の沿革とその診断的意義。最新医学，9：795～805，1954.
- 38) 川島健吉・稲葉英造：Refracting gastroscope. The Bulletin of Tokyo Med. and Dental College, 6: 293-317, 1959.
- 39) 川島健吉・稲葉英造：屈折式胃鏡（第1報）……構造と実施方法について。臨床の日本，4：43～58，1963.
- 40) 春日井達造・高瀬達郎：ファイバースコープによる生検および細胞診。臨床病理，12：546～548，1964.
- 41) 常岡健二ら：洗滌細胞診を主目的とする新しいファイバースコープについて。Endoscopy, 7: 22-23, 1965.
- 42) 福田保ら：胃癌の細胞診……最近の進歩。日本医学会誌，51：1767～1780，1964.
- 43) 亀谷晋ら：直視下胃生検，細胞診用ファイバースコープについて。Endoscopy, 6: 36-40, 1964.
- 44) Ledley, R.S., & Lusted, L.B.: Reasoning foundations of medical diagnosis. Science, 130: 9-21, 1959.
- 45) 増山元三郎：自動診断の統計的基礎。臨床病理，12：7～10，1964.
- 46) 宮脇一男ら：電子計算機による鑑別診断の試み。日本臨床，24：777～784，1963.
- 47) 鳥居敏雄ら：肝機能検査法の分析と総合。因子分析法，判別函数，棄却楕円を中心として。最新医学，7：138～152，1952.
- 48) 大島良雄ら：電子計算機による内科疾患の診断，計量医学序説。内科，12：86～97，1963.
- 49) 高橋昶正：自動診断への一步，計量診断学のための診断の情報処理。科学，34：358～364，1964.
- 50) 小坂淳夫ら：肝・胆道疾患における判別函数の応用。総合臨床，17：116～122，1968.
- 51) 木村栄一ら：電子計算機による心疾患の診断，ことに数量化理論による左室肥大の診断について。最新医学，22：738～748，1967.
- 52) 広門一孝：早期胃癌の胃カメラ診断計量化に関する研究，数量化による所見の重みづけと総合。医学研究，37：316～331，1967.
- 53) 佐野圭司ら：頭部外傷急性期の鑑別診断，計数表による推計学的診断。臨床外科，20：701～712，1965.
- 54) 四方淳一ら：急性腹症の計量診断。臨床外科，20：1483～1489，1965.
- 55) 福田保ら：胃細胞診における細胞判定の計量的方法について（第2報）。日臨細胞誌，5：133，1966.
- 56) 菅田毅：胃癌細胞診の計量化に関する研究。岡山医学会誌，83：207～228，1971.
- 57) Caspersson, T., Lomakka, G. and Rigler, R., Jr.: Quantative fluorescence microspectrophotometry for the determination of primary and secondary fluorescence of different cell structure. Proc. 2. Int. Congr. Histo-Cytochem., Springer, Germany, 87, 1964.
- 58) Naora, H.: Microspectrophotometry and cytochemical analysis of nucleic acids. Science, 114: 279-280, 1951.
- 59) Ris, H.: Quantative cytochemical determination of DNA with the Feulgen nucleal reaction. J. Gen. Physiol., 33: 125-146, 1949.
- 60) Leuchtenberger, C., Klein, G. and Klein, E.: The estimation of nucleic acids in individual isolated nucleic of ascites tumors by ultraviolet microspectrophotometry and its comparison with the chemical analysis. Cancer Res., 12: 480-483, 1952.
- 61) 御園生雄三，安里洋：核酸顕微測光法によるDNAの研究。第16回日本産婦人科学会宿題報告要旨，54～63，1964.
- 62) 後藤忠雄：産婦人科領域における腔内塗抹細胞（一部捺印塗抹細胞），組織切片及培養細胞の核DNA定量に関する研究。日産婦誌，20：375～384，1968.
- 63) 和泉元志：子宮頸腔部各種病変におけるDNAの組織化学的研究。日産婦誌，20：1469～1478，1968.
- 64) 岸上義彦：細胞診の自動化。日臨細胞誌，6：232～237，1967.

- 65) 田中一静: Fluorospectrophotometryによる塗抹細胞診断の客観化に関する研究. 日臨細胞誌, 10: 155~173, 1971.
- 66) 井手勝康: 簡易顕微分光計による子宮腔部細胞診の研究, 特にフォイルゲン染色, ガロシアンニン染色について, 日産婦誌, 28: 471~480, 1976.
- 67) 守矢和人: 簡易顕微分光計による子宮癌細胞診自動化の研究. 千葉医会誌, 49: 23~31, 1973.
- 68) 横田勝正ら: 測光顕微鏡による良・悪性細胞の判定基準について, 日臨細胞誌, 12: 212, 1973.
- 69) 竹口武夫: I. T. V. を利用したわが教室の細胞診自動化装置とその問題点. 日臨細胞誌, 16: 122~123, 1977.
- 70) 西谷巖ら: 癌細胞診の自動化に関する研究. 日臨細胞誌, 16: 122, 1977.
- 71) 山形敏一ら: 消化器癌の細胞診. 日臨細胞誌, 3: 63~68, 1964.
- 72) 木村禧代二: 胃癌の細胞診断, 核小体所見を中心に. 医学のあゆみ, 59: 別冊, 292~306, 1966.
- 73) 西川良平: 新鮮材料に基づく胃癌細胞の形態学的研究. 日臨細胞誌, 9: 135~148, 1970.
- 74) 春日井達造: 早期胃癌の剝離細胞の形態……主に胃生検組織片によるタッチスミアについて. 日臨細胞誌, 7: 50~51, 1968.
- 75) 松原丈喜: 早期胃癌の剝離細胞の形態について. 日臨細胞誌, 7: 52, 1968.
- 76) 早川澁ら: 胃直視下擦過細胞診の判定基準について. 日臨細胞誌, 8: 105~106, 1969.
- 77) 谷合明: 胃癌診断に関する臨床細胞学的研究…直視下採取法および剝離癌細胞の形態学的特徴について. 日臨細胞誌, 9: 2~41, 1970.
- 78) 山岸紀美江ら: 胃癌細胞の形態分析, 特に数量による診断の可能性. 日臨細胞誌, 12: 138~145, 1973.
- 79) 三戸康郎: 胃癌細胞診における核 DNA 量測定法の応用に関する考察. 日臨細胞誌, 12: 215, 1973.
- 80) 渡部庸一: 生検スタンプ細胞と洗浄細胞との形態学的差異, 胃細胞診スクリーニングにあたって. 臨床検査, 12: 1103~1106, 1968.
- 81) 田島基男: クロマチン形態から見た癌細胞の変性, 細胞診断学との関連を中心に. 診断と治療, 56: 305~316, 1968.
- 82) 中村忍: がん細胞の変性過程における形態学的研究, エールリッヒ腹水癌細胞の核の変性過程について. 金沢大十全医会誌, 83: 749~774, 1974.
- 83) 中村忍: がん細胞の変性過程, Histone について. 日臨細胞誌, 15: 181~187, 1976.
- 84) 藤井佑二ら: 胃癌細胞診計量化に関する基礎的研究. 日臨細胞誌, 16: 345, 1977.

Summary

A Fundamental Study of Quantitative Cytology in Gastric Cancer Cells

While gastric cytology is useful for the diagnosis of carcinoma of the stomach, the present method is entirely dependent on the subjective judgement of the examiner. In this study, I have tried to approach to the quantification of cell findings for the cytologic diagnosis by scanning of the nuclei of the exfoliated cells with a microspectrophotometer. The scanning was made through a 1μ pinhole, recording the absorbance curve at the $538m\mu$ wavelength, and the nuclear size, chromatin content, and chromatin pattern were analysed. The nuclear size was measured with a micrometer, the chromatin content was calculated as an integral of the absorbance curve, and the chromatin pattern was determined in the analysis of the waves. One hundred and sixty normal cells and the same number of cancer cells were scanned and the following results were obtained : When the nuclear size only was used as a parameter, correct diagnosis was made in 97.8% (313/320 cells) and only misdiagnosis in 2.2% (7/320 cells) ; when the chromatin content was used, 98.7% (316/320 cells) was correct and 1.3% (4/320 cells) was wrong ; and when the chromatin pattern only was used, 98.1% (314/320 cells) was correct and 1.9% (6/320 cells) was wrong. When two parameters were combined, only one of 320 cells was misdiagnosed, and all the cells were correctly diagnosed in combination of the three parameters.

YUJI FUJII, M.D.

*Department of Surgery, Juntendo University,
School of Medicine.*