有棘細胞癌

Percollを用いた密度勾配遠沈法による
単離有棘細胞癌細胞の比重とNC比及び
核切れ込み指数との関係

豊島 弘行* 堀 真* 吉田 彦太郎*

Summary

Trypsinで処理し、単離した有棘細胞癌細胞をpercoll(コロイド状シリカ)を用いた密度勾配遠沈法により、high density fraction(比重1.088以上)、intermediate density fraction(比重1.050~1.088)、low density fraction(比重1.050以下)の3分画に分離した。各分画の腫瘍細胞にGiemsa染色を施し、核面積、細胞質面積、核・細胞質比、核切れ込み指数などを測定し、比重との相関を検討した。

その結果、核・細胞質比は高比重分画の細胞ほど高い値を示したが、核面積、細胞質面積、核切れ込み指数などと比重との間には一定の関係がみられなかった。

緒 言

正常の表皮細胞は基底細胞から有棘細胞、顆粒細胞、そして角質細胞へと分化する。この分化過程が進行するにつれて核と細胞質の面積比(以下NC比)が減少し^{1)~4)}、その比重が低下することが既に報告¹⁾⁵⁾されている。すなわち、基底細胞がもっともNC比が大で高比重であり、顆粒細胞がもっともNC比が小で低比重であるとされている。

正常表皮と同様に有棘細胞癌も角化を示し、角化の程度により、その悪性度、分化度などが判断されている⁶⁾。そして、一般に有棘細胞癌の病理組織において周囲の正常組織に浸潤、拡大しつつある癌病巣辺縁部にはhematoxylin・eosin(以下HE)染色で好塩基性に染まる小型の

細胞が多く、pearl formationなどの角化の方向に向かいつつある癌病巣中心部には好酸性に染まる大型の細胞が多くみられる。すなわち癌病巣辺縁の細胞は増殖能が強い細胞で、癌真珠近くに存在する細胞は分化に傾いた細胞と考えられ、正常表皮と同様、比重による癌細胞の分離が可能と考えられる。

材料ならびに方法

実験材料：長崎大学医学部付属病院皮膚科を受診した65~87歳の有棘細胞癌患者5例から採取した5個の腫瘍組織を実験に供した。腫瘍はすべて顔面に存在し、直径3 cm以上で、病理組織学的に有棘細胞癌と診断されている。なお、各腫瘍の分化度は高く、多数の癌真珠がみられる。すなわち、Broders分類⁶⁾のgrade 1に相当する所見と考えられた(図1)。

腫瘍細胞浮遊液の作製：上記病巣を外科的に摘出し、ただちに腫瘍部のみを細切した後、

* Hiroyuki TOYOSHIMA, Makoto HORI, Hikotaro YOSHIDA: 長崎大学皮膚科学教室

図1. 実験材料として用いた腫瘍の病理組織学的所見。よく分化した有棘細胞癌である。(HE染色、 $\times 40$)

Hanks液 (pH7.3, Nissui) で作製した0.25% trypsin (1:250, Difco) 溶液 (pH7.8) に20℃, 20分間浸漬した。その後、ナイロンメッシュで濾過、Hanks液で洗浄して腫瘍細胞浮遊液を得た。

密度勾配遠沈法による分離：比重1.064に調整したpercoll-Hanks液に細胞浮遊液を加え、4℃20000G, 30分間遠沈した。遠沈により層状に分離した細胞集塊を、密度マーカービーズ (Pharmacia社) を比重マーカーとして用い、high density fraction (比重1.088以上, 以下HDF), intermediate density fraction (1.050~1.088, IDF), low density fraction (1.050以下, LDF) の3層に分画し、それぞれをHanks液で3回洗浄した後、スライドグラスに塗布した。

分離腫瘍細胞の核面積、細胞質、NC比および核切れ込み指数の測定：検体をスライドグラス上で100%メタノール液で固定後、Giemsa染色を施し、強拡大像 (400倍) で撮影、投影拡大し、planimeter (Uchida) を用いて、各分画50個の腫瘍細胞の核面積、細胞質面積、NC比およびSchreckら⁹⁾の方法による核切れ込み指数などを測定、算出した。

組織標本上の腫瘍細胞のNC比の測定：細胞境界の明瞭な腫瘍3個の病理組織標本 (HE染

色)の400倍光顕像において、癌真珠に近い好酸性の胞体を有する細胞群と癌真珠より離れた辺縁部の好塩基性胞体を有する細胞群、各々50個についてplanimeterを用いてNC比を算出した。

結 果

密度勾配遠沈法による分離：有棘細胞癌細胞浮遊液をpercollに加え、高速遠沈した後の所見 (図2右)では、ほぼ連続した比重をもって腫瘍細胞が分布していることが明らかとなった。比重マーカー (図2左)を参考にして分画した前述のHDF, IDF, LDFの各層においてみられた細胞を図3に示したが、高比重の分画ほどNC比が大きい傾向が認められた。

分離腫瘍細胞の核面積、細胞質面積、NC比および核切れ込み指数の測定：各腫瘍、各分画の癌細胞50個ずつの核面積の平均値 (図4), 細胞質面積の平均値 (図5), NC比の平均値 (図6), 核切れ込み指数の平均値 (図7)をそれぞれ図示した。また各分画ごとの核面積、細胞質面積、NC比、核切れ込み指数の平均値を表1に示す。核面積はLDF 167 ± 57 , IDF 219 ± 51 , HDF 277 ± 117 と各分画ごとの平均値では高比重分画ほど高い値を示すが、各々の腫瘍についてみると必ずしも高比重の分画で大きいわけで

図2. 密度勾配遠沈法による分離後の有棘細胞癌細胞 (右) および比重マーカービーズ (左) A: 1.050, B: 1.088の比重を示す。

図 3 . 各分画の癌細胞 (HE染色, ×400)

はない (図4)。細胞質面積はLDF538±147, IDF497±163, HDF529±145であり, 各々の症例についてみても, 比重との間に一定の関係はみられない (図 5)。NC比はLDF0.34±0.03, IDF0.46±0.01, HDF0.57±0.01と高比重の分画ほど高い値を示し (p<0.01), 各々の症例についてみてもその傾向を示している (図 6)。核切れ込み指数はLDF3.7±0.9, IDF3.7±0.2, HDF3.6±0.2と各分画ともほぼ同じ値であった。また, 各腫瘍についてみても核切れ込み指

図 4 . 各分画の腫瘍細胞と比重の相関

図 5 . 各分画の腫瘍細胞の細胞質面積と比重の相関

図 6 . 各分画の腫瘍細胞の核・細胞質比と比重の相関

図 7 . 各分画の腫瘍細胞の核切れ込み指数と比重の相関

表 1 . 各分画における 5 例の腫瘍の核面積、細胞質面積、核・細胞質比、核切れ込み指数の平均値

	L D F	I D F	H D F
核面積(μm ²)	167±57	219±51	277±117
細胞質面積(μm ²)	538±147	497±163	529±145
核・細胞質比	0.34±0.33	0.46±0.01	0.57±0.01
核切れ込み指数	3.7±0.9	3.7±0.2	3.6±0.2

数と腫瘍細胞の比重との間に一定の関係はみられなかった (図 7)。

組織標本上の腫瘍細胞のNC比の測定：癌真珠に近い好酸性胞体を有する細胞群 (図 8) のNC比は0.248±0.03, 角質より遠い辺縁部の好塩基性胞体を有する細胞群 (図 8) のNC比は0.528±0.02, であり, 前者が後者より低い値を示した。

図8. 有棘細胞癌の光顕像(HE染色, $\times 400$)。角質に近い好酸性の胞体を有する細胞群(A)より角質より離れた好塩基性の胞体を有する細胞群(B)の方が、核細胞質が大である。

考 案

今回われわれは単離した有棘細胞癌の癌細胞について、細胞の比重と核面積、細胞質面積、核不規則指数などとの間の相関を検討したが、一定の関係はみられなかった。しかし、高比重の腫瘍細胞ほど、NC比が高い傾向がみられた。

一般に、NC比が大きいほど未分化な細胞とされている⁷⁾。また、HDFに相当するNC比の大きな細胞は癌真珠と離れた腫瘍巣辺縁部に存在し、LDFに相当するNC比の小さな細胞は癌真珠に近い腫瘍巣中心部に存在していた。すなわち、高比重細胞は腫瘍巣の辺縁に存在し、増殖に関与した腫瘍細胞で、低比重細胞は癌真珠に近く存在し、よく分化した腫瘍細胞であると考えられる。

また、これらのことは有棘細胞癌の同じ腫瘍巣内において、腫瘍細胞に分化度の差がみられることを示している。扁平上皮癌の細胞は、他の腫瘍と比較して細胞質が豊富でNC比が小さく、より分化のすすんだ腫瘍であるといわれている⁸⁾。有棘細胞癌もより分化した腫瘍であるために、腫瘍でありながら正常表皮の分化を模し、その分化の種々の段階の腫瘍細胞がみられたのかもしれない。

さらに、今回の実験では5個の腫瘍の各々の分画の腫瘍細胞の切れ込み指数をSherckらの方法⁷⁾に従って計測し、比較検討したが、腫瘍細胞の比重との間に一定の関係はみられなかった。核切れ込み指数は電顕的に検討することが多く⁷⁾、光顕で測定した今回の実験では微細な核の変化を把握できなかったのかもしれない。

いずれにしても、今回の実験により比重という物理的な性質によりNC比、すなわち分化度という細胞学的な性質を分けてとらえられたことになるであろう。

文 献

- 1) 野村 洋文, 蜂須賀 裕志, 阿部 順一, 森理, 笹井 陽一郎: コロイド状シリカ (percoll) を用いた密度勾配遠沈法による表皮細胞の分離分画, 日皮会誌, **93**: 1237-1240, 1983
- 2) Laerum, D. D.: oxygen consumption of basal and differentiating cells from hairless mouse epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **52**: 204-211, 1969.
- 3) Vaughan, F. L., Bernstei, I. A.: Studies of proliferative capabilities in isolated epidermal basal differentiated cells. *J. Invest. Dermatol.* **56**: 454-466, 1971.
- 4) Stern, I. B., Sekeri-Pataryas, K. H.: The uptake of C- histidine by cell suspension of isolated strata of neonatal rat epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **59**: 251-259, 1972.
- 5) Sun, T., Green, H.: Differentiation of the epidermal Keratinocyte in cell culture: Formation of the cornified envelope. *Cell*, **9**: 511- 521, 1976.
- 6) Lever, W. F., Schamberg- Lever, G.: *Histopathology of the skin*, 6th ed, Lippincott, philadelphia, 1983. 499- 502.
- 7) Scheck, R.: Ultrastructure of blood, lymphocyte from chronic lymphocytic and lymphosarcoma cell leukemia. *J. Nat. Cancer. Inst.* **48**: 51- 64, 1974.
- 8) 小野江為則, 小林 博, 菊地 浩吉: 剥離細胞, 病理学, 理工学社, 東京, 1978, 517-521.