

子宮内膜癌及びその境界病変の基礎的研究 特に核酸・酵素学的検索

東京医科大学産婦人科学教室（主任：藤原幸郎教授）

佐藤 博己 秋 谷 清 根岸 能之
中村 文武 梅林 栄一 原 捷 平
奴田原裕一 小林 一彦 平岩 幹夫
三 谷 一 藤原 幸郎

A Basic Study of Cancer of the Endometrium and its Border Disease with Special Reference to Nucleic Acid and Enzyme Activity

Hiromi SATO, Kiyoshi AKIYA, Yoshiyuki NEGISHI, Fumitake NAKAMURA,
Eiichi UMEBAYASHI, Shohei HARA, Yuichi NUTAHARA, Kazuhiko KOBAYASHI,
Mikio HIRAIWA, Hajime MITANI and Yukio FUJIWARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College, Tokyo
(Director: Prof. Yukio Fujiwara)

概要 子宮内膜癌及びその境界病変と考えられている子宮内膜腺増殖症は諸因子との関連が複雑で解明されざる点が多い。そこでその特性を検索し臨床面に応用するべく Normal endometrium 20例, Endometrial hyperplasia 25例, Endometrial adenocarcinoma 20例について核酸ならびに酵素学的検索を以下の方法で行った。即ち核酸 Deoxyribonucleic acid (DNA) 量は Feulgen 染色を施した組織標本を使用して2波長法で、酵素群の Lactic dehydrogenase (LDH), Alkaline phosphatase (ALP), Hexokinase (HK) は各々の組織活性値, Isozyme 分離及び組織化学染色を行い次の結果を得た。

① 核 DNA 量: Normal endometrium 及び Cystic hyperplasia の計31例全例が diploid~tetraploid を Adenocarcinoma は全例 aneuploid の DNA ploidy を示したが Atypical hyperplasia では14例中3例に aneuploid の histogram pattern を示した。

② 酵素群: a) LDH は M/H 比 0.5以上を示すものが Atypical hyperplasia 14例中4例に Adenocarcinoma 20例中16例に認められた。b) ALP は Normal endometrium 及び Cystic hyperplasia 31例中8例に 2,000 IU/wet. gi.以上の活性値を示したが, Heat-stable ALP (HSAP) では全例 100IU/wet. g. 以下である。これに対し Atypical hyperplasia, Adenocarcinoma では増加傾向に有り, 殊に HSAP では Atypical hyperplasia 14例中8例に Adenocarcinoma 20例中11例に 100IU/wet. g. 以上の高活性を示した。c) HK では Hyperplasia で II/I 比が Adenocarcinoma に接近することが認められた。d) 組織化学染色では3者共に活性は核・間質で弱く細胞質に強く認められ, 殊に LDH, ALP では腺腔側に強く認められた。Adenocarcinoma での ALP 活性は多様性を示した。

Synopsis Cancer of the endometrium and endometrial glandular hyperplasia, which is considered to be a border disease of the former, have complicated relation to various factors and there are many problems to be solved as to the characteristics of these diseases. We investigated nucleic acid and enzyme activity in 20 normal endometrium, 25 endometrial hyperplasia and 20 endometrial adenocarcinoma cases for the purpose of clinical use. The deoxyribonucleic acid (DNA) content was determined by the two-wave length method in Feulgen-stained histological preparations. Enzymological investigations of lactic dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) and hexokinase (HK) were carried out by determining activity in tissue, separating isozymes and staining histochemically. The results

obtained are summarized as follows.

(1) DNA content of the nucleus: The DNA content was diploid to tetraploid in all of the 31 normal endometrium and cystic hyperplasia cases, and aneuploid to DNA ploidy in all of the adenocarcinoma cases while it showed aneuploid-histogram pattern in 3 of 14 atypical hyperplasia cases.

(2) Enzyme group: a) LDH was not less than 0.5 in M/H ratio in 4 of 10 atypical hyperplasia cases and in 16 of 20 adenocarcinoma cases; b) ALP was not less than 2,000 IU/wet. g in activity in 8 of 31 normal endometrium and cystic hyperplasia cases while the heat stable alkaline phosphatase (HSAP) activity was not more than 100 IU/wet. g in all of the cases. However, the activity of ALP tended to increase in atypical hyperplasia and adenocarcinoma cases and not less than 10 IU/wet. g especially in 11 of 20 adenocarcinoma cases; c) As to HK, hyperplasia cases were near to adenocarcinoma cases in II/I ratio; d) As to the activity in histochemical staining, the 3 enzymes was weak in both nucleus and interstitium, being stronger in the cytoplasm, and the staining of LDH and ALP was especially strong on the side near to the glandular cavity. The activity of ALP was manifold in adenocarcinoma cases.

緒 言

従来、我国に於ける子宮体部癌患者数の動態は子宮癌全体の4～5%にすぎなかったが1968年頃より増加傾向を示し、現在では10～15%にも達していると言われている。一方西欧諸国ではかなり患者数が多く、ヨーロッパ系で10～15%、アメリカ系で20～25%という報告があり、人種、生活環境、生活程度等が体癌の発生率に密接な関係を有するとされている。これに加えて不妊症・肥満・高血圧・糖質代謝異常等の体質的因子も関与すると同時に、エストロゲンが発癌促進因子であることは実験的、臨床的に明らかになりつつある。

現在、内膜癌及びその前駆病変（境界病変）の診断は組織学的検討が主となつているが境界病変の診断にあつてはこの方法のみでは判定困難な場合もあり新たな検討法の確立がいそがれている。

そこで我々はその特性を検索し、臨床面で診断に応用すべく細胞レベルで核のDNA量を、組織レベルで酵素学的研究を組織形態学的検索と合わせ、Normal endometrium, Endometrial-hyperplasia, Endometrial adenocarcinoma について検索し若干の知見を得たので報告する。

研究資料並びに研究方法

研究資料：当教室での手術並びに子宮内膜試験ソウハ材料を使用した。疾患別の内分けは表1の如くである。

研究方法：表1に示した如くである。

表1 研究資料及び方法

研究資料	
Normal endometrium :	20例
Endometrial hyperplasia :	25例
Cystic hyperplasia :	11例
Atypical hyperplasia :	14例
Endometrial adenocarcinoma :	20例
研究方法	
1. Deoxyribonucleic acid (DNA)	
検索組織標本に Feulgen 反応を施し、顕微	
分光々度計にて2波長法で測定	
2. 酵素群	
a. 活性値測定	
○ Lactic dehydrogenase (LDH): Hill 氏変法	
○ Alkaline phosphatase (ALP): Hycel 氏法	
○ Hexokinase (HK): Salas 法	
b. Isozyme 分離: 電気泳動法	
c. 組織化学染色	

1. 核 DNA 量：資料組織を12 μ に薄切し、Hematoxyrin-Eosin 染色及び Feulgen 染色を施し、H.E 染色標本にて測定対象細胞を選択し、Feulgen 染色標本にてその細胞核 DNA 量を顕微分光々度計 (MMSP) を使用して2波長法で測定した。単位は全て任意単位 (A.U) で表わした。尚 control には各組織のリンパ球を同時に同方法で測定し、その平均値より diploid (2n) を想定した。

2. 酵素群：a) 活性値測定は LDH は pyruvate を基質とし Hill 氏変法で測定、単位は Hill 変法単位 U/wet. g. とした。ALP, HK も各々基質に thymolphthalein monophosphate, glucose

を使用し, Hycel 法, Salas 法で測定し単位を IU/wet. g., U/protein g. で表わした.

b) Isozyme 分離は小川式微量分析泳動装置を使用し, LDH ではセルロースアセテート膜を支持体とし70分間泳動, 染色は Rabbo の処方に準じた 斉藤の方法で行った. ALP はポリアクリルアミドゲルを支持体とし 60分間泳動, 染色は Haije 原法を又同時に Neuraminidase 0.1mg と試料0.1ml を37°C20時間 incubate し電気泳動を行い活性帯の移動度をも検討した. HK はセルロースアセテート膜を支持体とし70分間泳動し, 染色は Sato の方法に準じた.

c) 組織化学染色法で LDH は磷酸緩衝液 (pH 8.6, イオン強度0.1) に乳酸ナトリウム, NAD, NBT, PMS, NaCN を含む 1% Agar 液をプレパラートにひいて染色板を作製し, 凍結切片を密着させ室温にて incubate し, ホルマザンの発色を顕微鏡にて観察した. ALP は0.5Mの AMP 緩衝液に0.01Mの BIP を加えた染色液に37°C30分間凍結切片を密着させ carnoy 液に固定, 59°C 1N の HCl にて加水分解後 Schiff 液にて核染色を実施. 又 HK では0.1M glucose 5mM ATP, 5mM $MgCl_2$, 0.4u/ml G6PDH, 1mM NADP, 2mM KCN, 25 μ g/ml PMS, 0.4mg/ml NBT を含む 1% Agar をプレパラートにひいて染色板を作製し, 凍結切片を密着させ室温にて incubate し, ホルマザンの紫色の発色を検鏡した.

研究成績

1. 核 DNA 量

図 1, 2 はコントロール, 正常子宮内膜並びに子宮内膜各種病変の histogram である.

Normal endometrium では分泌期より増殖期の方が多少核 DNA 量は増加する傾向にあるが, Mean(M): 15.4~16.5, standard deviation(S); 2.1~2.9でいずれも diploid~tetraploid の ploidy で単峯性の pattern を示した. Cystic hyperplasia はM; 13.5~18.5, S; 2.9~6.9と核 DNA 量, histogram pattern 共に Normal endometrium とほぼ同様であつた. Atypical hyperplasia はM; 16.0~23.4, S; 3.6~6.3であり histogram では

図 1 DNA histogram pattern (I)

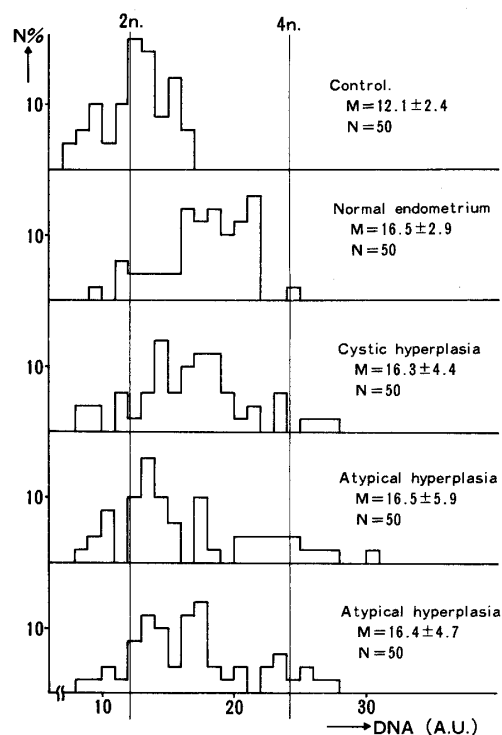
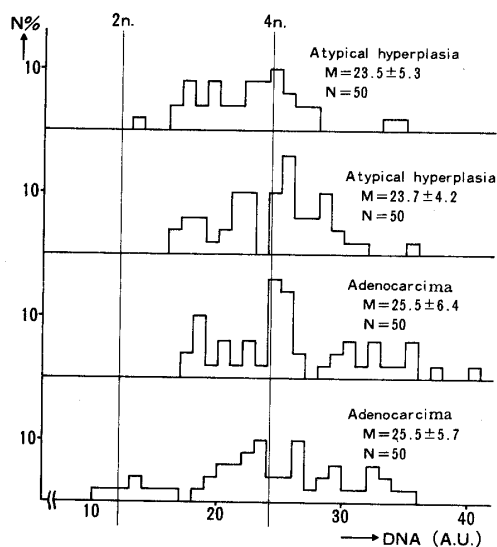


図 2 DNA histogram pattern (II)



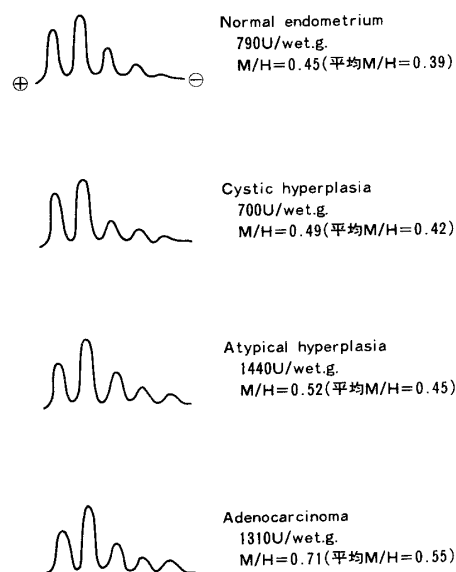
分布域も拡がり, peak も右方推移し aneuploid に近い ploidy を示したが, 特に14症例中3症例については M, S 共に高値を示し多峯性の pattern を示し悪性のそれに酷似した. Adenocarcinoma ではM; 20.0~26.4, S; 3.3~7.8で核 DNA 量は高値で histogram も aneuploid の pattern を呈した.

2. 酵素群

正常子宮内膜, 子宮内膜増殖群それぞれの代表例の LDH, ALP, HK の Isozyme pattern, 活性値並びに組織化学染色標本を示す.

図3は LDH の Isozyme pattern 並びに活性値である. 即ち Isozyme pattern では本酵素アイソザイムは LDH₁ から LDH₅ 迄分かれるが, 我々は pattern の性格をより明確にするためH型, M型 subunit の比即ち M/H 比を算出し検討すると,

図3 LDH Isozyme pattern 及び M/H 比



その平均値は Normal endometrium 群で0.39, Cystic hyperplasia 群で0.42, atypical hyperplasia 群0.45, adenocarcinoma 群で0.55と非癌, 癌組織を比較した場合に癌組織では明らかに陰極よりの pattern を示し両者の差が明らかに認められた. 組織化学染色で Atypical hyperplasia では内膜腺々腔側の腺細胞殊に細胞質に強い活性を示すが, 核・間質にはほとんど活性は認められず (写真1), Adenocarcinoma では病巣全体に不規則ながらかなり強い活性を認めた (写真2).

図4は ALP で no inhibition, neuraminidase treatment を施した各群の Isozyme pattern 模式図並びに活性値を示す. 各群共に no inhibition では3本の活性帯が認められ, 本研究ではこれを陰極側より ALPa, ALPb, ALPc と名命した. neuraminidase treatment を施すと1~3本の活

写真3 ALP zymogram (Adenocarcinoma)
上: no inhibition, 下: neuraminidase treatment
(→印: ALPc')

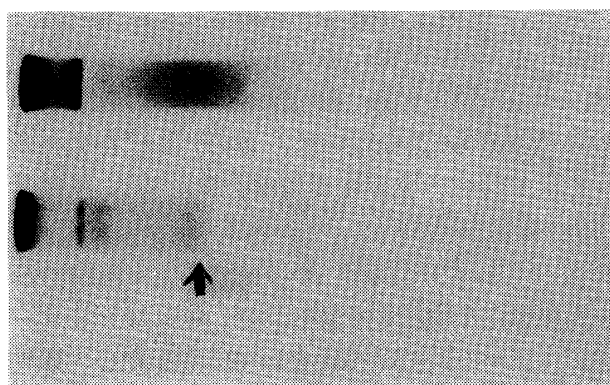
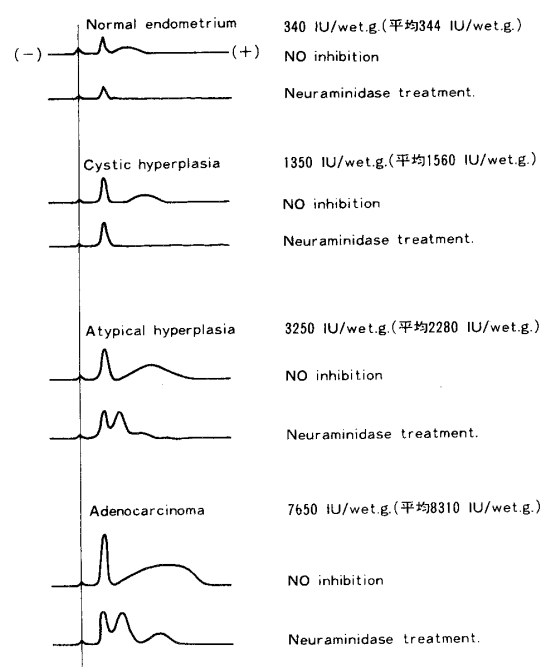
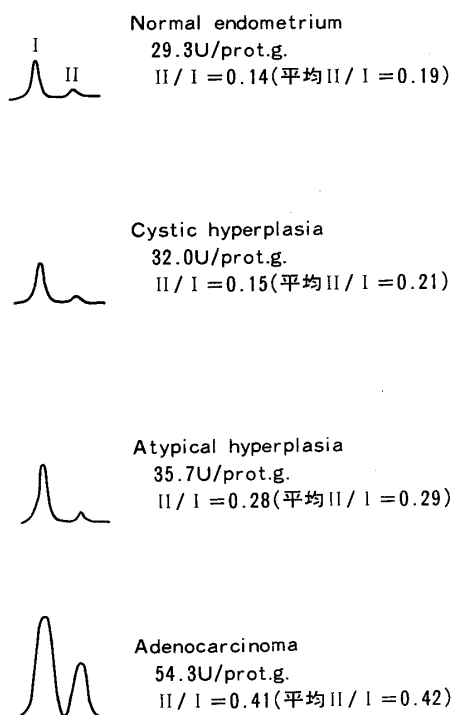


図4 ALP Isozyme pattern 及び活性値



性帯が認められ, これらの活性帯の移動度は夫々陰極側へ ALPa は0%, ALPb は30%, ALPc は40%であつたが ALPc のうち Adenocarcinoma例では移動度の少ないもの (ALPc' : 移動度20%) が認められた (写真3→印). 次に活性値平均では Normal endometrium 344, Cystic hyperplasia 1,560, Atypical hyperplasia 2,280, Adenocarcinoma 8,310IU/wet. g. と LDH 同様に組織学的悪性度に比例して上昇傾向を示した. 組織化学染色では Atypical hyperplasia で腺腔面がかなり強

図5 HK Isozyme pattern 及び II/I 比



く染色され(写真4), Adenocarcinoma でも癌上皮の腺腔側に強い活性を認めるが部位及び分化度により染色性に強弱を示す等多様性を示した。(写真5)。

図5は HK の Isozyme pattern と活性値である。即ち HK の Isozyme は I 帯と II 帯に分離されるが II 帯は活性値が低く II/I 比平均値は Normal endometrium 群0.14, Cystic hyperplasia 群0.15, Atypical hyperplasia 群0.29, Adenocarcinoma 群0.42と組織学的悪性度と比例して高値を示すが特に非癌と癌を比較した場合2～3倍の高値を示した。組織化学染色では腺細胞の細胞膜・原形質に強い活性を示すが核・間質には弱く特に Adenocarcinoma 例で強い濃染性を示した(写真6, 7)。

以上成績を総括すると核 DNA 量では組織学的悪性度と DNA 含有量との関係で表2の如く組織学的悪性度と DNA 含有量は平行する傾向を示すが, Atypical hyperplasia の核 DNA 量は平均16.9 A.U. と Cystic hyperplasia より高く特に3例に DNA 含有量, 分布域共に Adenocarcinoma と同様の値, ploidy pattern を示した。

表2 総括(I)
組織学的分類と DNA 量分布域の関係

組織学的分類	DNA 量分布域
Normal endometrium 20例	Diploid～tetraploid 20例 (15.5)
Cystic hyperplasia 11例	Diploid～tetraploid 11例 (15.7)
Atypical hyperplasia 14例	Diploid～tetraploid 11例 (16.9) Aneuploid 3例 (23.2)
Adenocarcinoma 20例	Aneuploid 20例 (23.8)

() 平均値

表3 総括(II)
組織学的分類と酵素活性及び Isozyme の特性

組織分類 酵素活性特性	Normal endometrium & Cystic hyperplasia (31)	Atypical hyperplasia (14)	Adenocarcinoma (20)
LDH M/H 比0.5以上	0/31	4/14	16/20
ALP 2300 I.U./wet.g 以上	8/31	6/14	20/20
HSAP 100 I.U./wet.g 以上	0/31	3/14	15/20
HK II/I 比0.3以上	4/31	4/14	15/20

HSAP: heat-stable ALP. (): 症例数

表3は組織学的分類と酵素活性及び Isozyme との関係である。尚, 悪性境界の基準は各平均値その他統計学的に算出したものである。

LDH で M/H 比0.5以上を示すものは Atypical hyperplasia 14例中4例に, Adenocarcinoma 20例中16例認められ, ALP では Normal endometrium 及び Cystic hyperplasia 31例中8例は2,300IU/wet. g. 以上の活性値を示したが, 耐熱性 ALP は全例100IU/wet. g. 以下であつた。これに対して Atypical hyperplasia 14例中6例に, Adenocarcinoma では20例中15例に100IU/wet. g. 以上の高活性値が認められた。HK でも Hyperplasia は Normal endometrium と Adenocarcinoma の中間に位置づけられ, 時に Atypical hyperplasia は II/I 比0.3以上を示す症例が14例中4例と Ad-

enocarcinoma に接近するのが認められた。

考 案

癌と核酸並びに酵素学的変化については以前より診断・治療効果並びに予後判定の立場より種々検討されてきたが、癌前駆病変特に内膜癌前駆病変については諸因子との関連が複雑で未解決な点が多い。そのため本研究では核酸特に DNA, 酵素の両面から検討を加えた。

1. 核 DNA 量

Leuchtenberger et al.¹²⁾ は正常細胞においてはいかなる組織に由来する DNA 量もそこに一定性があり染色体数とも密接な関係があるとし、Jones (1968), Auersperg (1967) らも正常細胞では 2 倍体で稀に 4 倍体 が出現すると発表している。又、Harkin¹¹⁾, Dieter et al.⁸⁾ も月経周期の整調な子宮内膜細胞について検索し $2n \sim 4n$ であると発表している。本研究に於いても Normal endometrium では $M=15.4 \sim 16.5$, $S=2.1 \sim 2.9$ と histogram は幅狭く単峯性をなしており諸家の報告と一致した。

次に Endometrial hyperplasia と子宮腔部 Dysplasia を前駆病変と考えた場合、和泉²⁾は Dysplasia の核 DNA 量変異は正常細胞より明らかに拡大するとし、有宏 (1966), 大須賀 (1970) も略々同様の報告をしている。一戸³⁾は Dysplasia を mild type と server type に分類して検討したが、前者は核 DNA 量の mode は $2 \sim 4$ 倍体にあり、後者はその分布域も著しく広くなり 10 倍体を示すものもあり、その拡がりからみれば carcinoma in situ と類似の pattern を示したとしている。又、Wambach et al.¹⁰⁾ は Atypical (Adenomatous) hyperplasia のなかにも DNA 含有量、分布域から悪性と考えられる症例があると述べている。本研究に於いては Cystic hyperplasia は Normal endometrium と同様に diploid~tetraploid を示したが Atypical hyperplasia の 14 症例中 3 例に aneuploid の histogram pattern を示し Adenocarcinoma と同じレベルのものが認められた。Adenocarcinoma では Dieter et al.⁸⁾, Fettig¹³⁾, 西谷ら⁵⁾は aneuploid の histogram pattern を示

すと述べているが他方 Sachs 等は Endometrial adenocarcinoma の 2/3 は DNA 含有量は peridiploid であつたとの報告もある。今回著者らの検討では Adenocarcinoma の全症例は aneuploid の histogram pattern を示した。

2. 酵素系

Lactic dehydrogenase は悪性腫瘍に於ける Isozyme では最も早くから研究されているが子宮内膜及びその病変に関する報告は少ない。本邦での坂田⁶⁾の報告によれば正常子宮内膜の分泌期は増殖期に比し活性が少々高く、又、Isozyme も少々陰極寄りを示したとし、内膜腺癌では活性値、M/H 比共に高く陰極移行を示したとしている。本研究に於いては前記の如く組織学的悪性度と LDH 活性値は必ずしも平行しない症例もみられ、活性値のみの変化で診断応用への価値は少ないと考えられるが、一方 Isozyme での M/H 比は良性・悪性の境界値を 0.5 と仮定した場合、Normal endometrium, Cystic hyperplasia では 31 例中全症例がそれ以下であり、Atypical hyperplasia 14 例中 4 例 (28%), Adenocarcinoma で 20 例中 16 例 (80%) と組織学的悪性度と比例した結果が得られ、活性値より診断的価値は大きいと考えられ、すでに発表した他の婦人科悪性腫瘍に於ける成績と同様の傾向を示した。

Alkaline phosphatase は諸家の報告によれば ALP のうち耐熱性 ALP (HSAP) としていくつかの Isozyme が総称され、そのうち胎盤性 ALP, 癌由来の Regan Isozyme, Nagao Isozyme 等が次々発表され現在に至っている。本研究では ALP 活性にとどまらず、組織抽出液を 56°C 水槽中にて正確に 30 分間 incubate した後可及的速やかに ALP 活性値と同様の測定法で測定した HSAP, 並びに Neuraminidase treatment による Zymogram pattern の変化について検討を加え、その成績については前記の如くであるが、ALP 活性値は組織学的悪性度と比例して高値を示した。特に HSAP で Atypical hyperplasia, Adenocarcinoma で各々 14 例中 3 例, 20 例中 15 例に認められた事は秋谷ら¹⁾, 梅林⁷⁾らの報告と一致した。又、ALPc

佐藤論文附图

写真1 Atypical hyperplasia (LDH 染色)

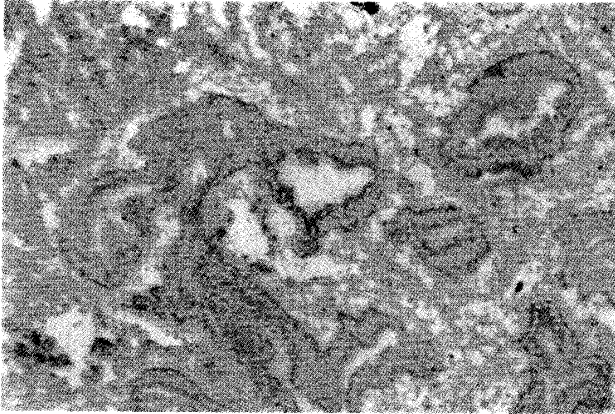


写真2 Adenocarcinoma (LDH 染色)



写真4 Atypical hyperplasia (ALP 染色)

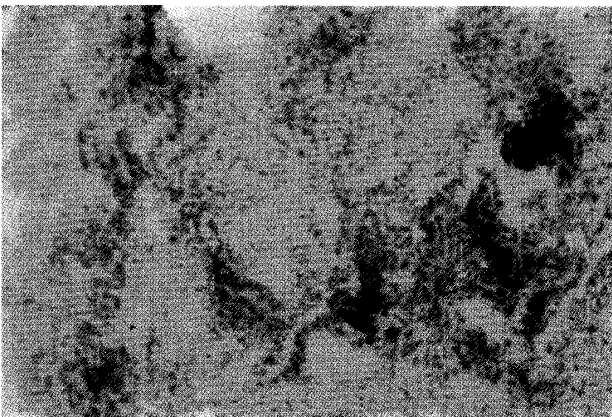


写真5 Adenocarcinoma (ALP 染色)

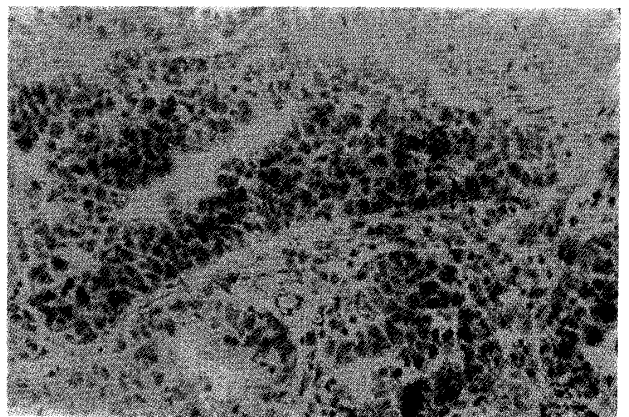
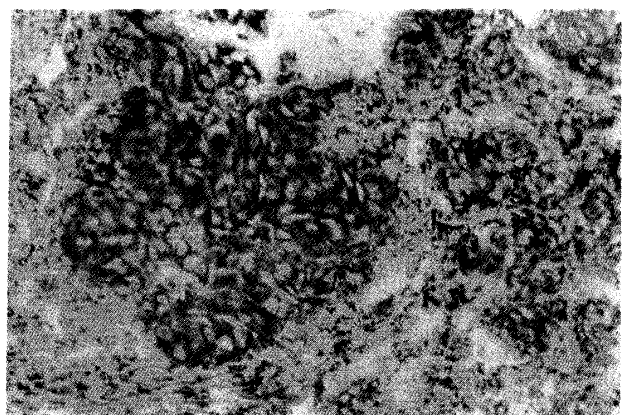


写真6 Atypical hyperplasia (HK 染色)



写真7 Adenocarcinoma (HK 染色)



の内、陰極側への移動度が20%とすくない ALPc が認められた事は注目に価するが、これが悪性腫瘍に特有なものか否かは今後の研究に待ちたいと考える。ALP 組織化学染色については腺腔面がかなり強く染色されるが、Adenocarcinoma では組織学的分化度と密接な関係を有する様に考えられる。即ち未分化型では癌巢全体に染色性が認められるが、分化型では活性のある部位とそうでない部位がまちまちであり、特に間質に弱い染色性を示す症例が認められた。又、同一症例連続切片で56°C恒温槽で30分間 incubate した無処置の標本と同一条件で染色した場合に熱を加えた標本では染色性が消失する部位があるのは興味深い。

Hexokinase は解糖系の第一段階である glucose が glucose-6-phosphate に変化するのに必要な酵素の一つであり Gouzalez (1964), Katzen (1965) らが Isozyme の分離に成功して以来諸家の報告がある。又、正常組織、悪性組織の比較検討で菊地⁴⁾は子宮頸癌について報告している。本研究でも癌組織と正常組織では前者で総活性値の増加がみられ特にⅡ帯の増加が著明でありⅡ/I比平均で正常組織で約2倍の高値を有し、0.3を良性、悪性の境界値とすると、それ以上の値を示す症例の発生率は悪性度の増加に比例して増える事が判明した。又、平岩 (1977) らは DISC 電気泳動法を用いより詳細な Isozyme pattern の分離に成功し、その特異性について検討を加えて成果を得ている。

以上 Normal endometrium, Endometrial hyperplasia, Endometrial adenocarcinoma 等について核 DNA 量、酵素活性値並びに Isozyme pattern を検討した結果、組織学的悪性度と核 DNA 量、酵素活性値、Isozyme pattern 等は互に密接な関係を有する事が判明したが、注目すべき事は組織学的悪性基準を十分に満足しない server type の Atypical hyperplasia と考えられる症例の中に悪性を示唆するものが含まれている事が判明し、かかる症例は carcinoma の部類に入れるべきで厳重な follow-up が必要であり同時に核酸、酵素等

の一体化された解析が子宮内膜癌前駆病変の診断、予後判定面で今後重要であると考えらる。

文 献

1. 秋谷 清, 梅林栄一, 原 捷平, 小林一彦, 平岩幹夫, 藤原幸郎: 婦人科悪性腫瘍の酵素学的特性の検討. 日産婦誌, 29: 943, 1977.
2. 和泉元志: 子宮頸部各種病変に於ける DNA の組織化学的研究. 日産婦誌, 20: 1469, 1968.
3. 一戸喜兵衛: 産婦人科領域に於ける腫瘍の染色体学的研究. 第22回 日産婦学会宿題, 1970.
4. 菊地義公: ヒト子宮癌のヘキソキナーゼアイソザイムについて. 日産婦誌, 23: 1045, 1971.
5. 西谷 巖, 菊地徳博, 沓沢 武, 武山信一: 子宮体癌の診断—組織診断の要点とその背景. 産と婦, 142: 21, 1975.
6. 坂田 稔: 婦人科領域に於ける各種癌組織の乳酸脱水素酵素アイソザイムに関する研究. 東京医大誌, 28: 551, 1970.
7. 梅林栄一: 産婦人科領域におけるアルカリフォスファターゼの研究. 東京医大誌, 33: 707, 1975.
8. Dieter, W., Richart R.M. and Jacob. Y., Terner: DNA content of human endometrial gland cell during the menstrual cycle. Am. J. Obst. & Gynec., 100: 1, 1968.
9. Dieter, W., Richart R.M. and Jacob. Y., Terner: DNA content of presumed precursors of endometrial carcinoma. Cancer, 20(12): 2067, 1967.
10. H. Sache, E.U. Wambach, K. Wurthner: Zytotometrisch ermittelter DNS-Gehalt im normalen hyperplastischen und Karzinomatosen menschlichen Endometrium. Arch. Gynäk., 217, 1974.
11. Games C. Harkin, M.D.: Deoxyribonucleic acid content of human endometrium. A.M.A. Archives of pathology, 24, 1955.
12. Leuchtenberger, C.R., Leuchtenberger: A microspectrophotometric study of the deoxyribonucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissue. Am. J. Pathol., 30: 65, 1954.
13. Othmar, F.: ³H-Index-Bestimmungen und Berechnungen der mittleren Generationszeit (Lebensdauer) der Einzelabschnitte des gesunden und krankhaften Endometrium nach autoradiographischen Untersuchungen mit ³H-thymidin. Arch. Gynäk., 217, 1974.

(No. 4307 昭53・1・11受付)