

教育講演

婦人科細胞診の理論と実際

佐々木研究所付属杏雲堂病院婦人科部長 杉 下 匡

Gynecological Cytology in Theory and Practice

Tadashi SUGISHITA

Department of Gynecology, Sasaki Institute Kyoundo Hospital, Tokyo

はじめに

婦人科細胞診のなかでも、近年特に注目すべきことは、子宮頸部の異形成から早期癌に至る過程を推定する細胞診の形成理論の変革とその実際の細胞所見の見方である。

この領域の細胞診において、剝離細胞の形成機序を理論的に説明する際に度々経験する困難は、軽度異形成に始まった一連の変化が、中等度異形成を経て高度異形成に至り、やがては上皮内癌(早期癌)に進行する過程の連続的解釈であった。

すなわち、従来からの細胞診理論では、上皮を形成する旁基底層、中層、表層のうち各層の異常細胞が出現すれば軽度異形成、旁基底層と中層の異常細胞が出現すれば中等度異形成、旁基底層だけの異常細胞が出現すれば高度異形成と診断していた。この細胞診理論の組織背景には異形成では、上皮内の異常細胞の発生母地はまず旁基底層あるいは基底層であって、その異常細胞の分化の高さによって分類されており、上皮の表層側2/3が分化すれば軽度異形成、表層側1/3が分化すれば中等度異形成、分化がみられなければ高度異形成又は上皮内癌と規定されている。

さて、ここでいう分化とは上皮の成熟と同義語に使われている。元来分化とは細胞の機能と形態を変えることであり、成熟とは形態が変化しても機能は変わらないことである。

異形成で発生する異常細胞が、分化したのか成熟したのかは正確には定かでない。もし成熟であれば異常成熟 abnormal maturation である。異常細胞もしくは癌細胞が分化するのか否かについては議論が残る。

また異形成でいう異常細胞の異常はすべて核異常のみである。核異常細胞の細胞質は正常形態を示す。なぜ異形成では核異常が主体なのか正確な解説がなされていない。

この理論の実際において、説明上感じた困難は、病理組織診断基準と細胞診の診断基準が、組織レベルで異なることである。すなわち異常細胞の層の上皮内における占拠率はともに同じ基準であるが、軽度異形成を例にとると、病理学的解釈では表層側2/3の成熟層が全く正常細胞であると考えられる。この考えでは細胞診に出現する中層、表層の核異常細胞の起源が分からない。結局、細胞診では異常細胞が分化又は成熟すると考え、病理学では異常細胞は分化しないと解釈したことになる。

しかし深層からの異常細胞とは全く別の原因で中層、表層の細胞に異常が発生したとなると、この両方の解釈はともに正しいことになる。

さらに、上皮内に分化がみられない高度異形成又は上皮内癌では、癌化の境界が不明瞭である。

Richart が提唱した CIN (cervical intraepithelial neoplasia) の分類法も彼自らそれを放棄したのも、この辺に原因があったのかもしれない。

以上述べてきた問題点について最近話題となっている HPV (human papilloma virus) 感染症とその細胞変化について、論文的考察も加えて考えてみる。

HPV 感染症とその細胞変化

1976年に Meisels and Fortin によって初めて koilocytosis (核周囲空洞) の病変が発表されるとともに、dysplasia は HPV の病変であると報告された。さらに注目すべきことは HPV に感染した

基底層の細胞はウイルスの特殊な遺伝子の発動により中層細胞を刺激し、増殖能を与え、核分裂を起こさせる結果、2核や多核が生ずると指摘した。

それでは HPV とはどんなウイルスなのだろうか探ってみよう。

① Human Papilloma Virus

HPV はパポウイルス群の一つで、小型の環状二本鎖の DNA 型ウイルスであり、7,900bp の塩基対を持つ。DNA 型ウイルスの特徴はウイルスの DNA とヒト細胞の DNA とが DNA の複製機構に共通性があり、自ら増殖することのできないウイルスはヒトの細胞の複製因子を利用することである。

HPV の多くは臓器や組織に特異性があり皮膚や粘膜に疣贅を作り、分化した角化細胞を増殖のために必要とすることが知られている。HPV-DNA の塩基配列の中で塩基対の構成がほかと比較して50%以上異なる場合は、型を別にして分類することになっている。

現在その型も66種類に分類されている。特に婦人科領域で問題になる型は20種類程度あって、特に癌ウイルスとして有名なタイプは16型、18型、45型、56型の各型である。また子宮頸部の扁平上皮癌には16型が、腺癌には18型が多いといわれる。

電子顕微鏡で観察すると、ウイルス粒子はエンペロープを持たない72の構造単位が集合した正20面体のカプシッドがコアとなる DNA クロモゾームを包み込んでいる。

ウイルス粒子の直径は約44~55nm である。

② HPV16型の増殖と cell-cycle への影響

HPV16型は自己増殖のために子宮頸部の扁平上皮の表層及び中層細胞に感染する。

分化し角化したこれらの層はウイルス増殖の必要条件を満たす target cells である。

感染巣において完全ヴィリオンとして存在する場合は感染能力を有するが核内に入り蛋白質の被膜を持たないエピソーム (episome) となると感染能力を失う。HPV-DNA エピソームとは核内にあってヒトの染色体の中には入らず、独立して複製される染色体外環状 DNA 分子のことである。

一方ヒトの DNA の中に HPV-DNA が組み込

まれる場合がある。組み込まれるためには環状 DNA 分子の環状の一部が切れて ORF (Open Reading Frame) となる。

ORF には初期遺伝子として E₁ から E₇ までと後期遺伝子 L₁ と L₂ がある。

初期遺伝子群は DNA の複製を司り、後期遺伝子群はカプシッドの複製に関与する。

そのほかに LCR (long control region) があり、ここでは転写調節を行っている。

環状の一部が切れて組み込まれる時、E₂ 遺伝子の所で起こることが多いという。この遺伝子は転写を調節しているといわれ、E₂ 遺伝子が分断されると転写調節機能を失うという。

ヒト染色体17番短腕には増殖抑制遺伝子 P⁵³ があり cell-cycle の G₁ 期の cycle-time を調節している。著者の計算ではヒトの正常子宮頸部の扁平上皮細胞の cell-cycle time は平均11.7時間であり、そのうち G₁ 期時間は FLSm 法 (Fraction of labeled cell in mid-S Phase 法) で平均2.4時間である。

P⁵³ 抑制遺伝子が機能するために転写を行い P⁵³m-RNA が細胞質に向い、P⁵³ 蛋白を合成する。

一方その細胞に感染した HPV の E₆ 蛋白とこの P⁵³ 蛋白に親和性があり、細胞質内の蛋白レベルで結合するため P⁵³ 蛋白は核内に戻ることができず、核内 P⁵³ 蛋白の減少を来すため P⁵³ 抑制遺伝子は機能消失をみる。その結果、cell-cycle の G₁ 期の cycle-time が促進され多くの細胞が cell-cycle の S 期 (合成期) に突入し、核酸の過剰合成、引き続き M 期 (分裂期) に突入し異常核分裂を招く。これらはすべて増殖促進であり、その結果すべて核異常として出現する。このほか、P²¹ 抑制遺伝子なども発見されており同じメカニズムが考えられている。

また、ヒト染色体13番長腕には増殖抑制遺伝子 RB があり、核内の TGFβ 1 蛋白の RB プロモータへの転写促進作用に助けられて、転写し、細胞質内で RB 蛋白を作り、それが E2 Factor と結合する。

E2 Factor はもともと増殖遺伝子である myc や myb, EGFR や DHFR などのプロモータへ働

く転写促進因子であるが、RB 蛋白との結合によって遊離 E2 Factor の減少を来し、その結果、通常は増殖促進系が抑制によってコントロールされている。しかし、HPV が感染すると HPV-E₇蛋白と RB 蛋白との親和性から結合が起こり、RB 蛋白と結合するはずの E2 Factor の相手がなくなるために遊離して増加する結果、増殖遺伝子のプロモータへ働き転写促進、増殖系促進となる。この場合は cell-cycle の G₀期から G₁期への導入が促進される。いずれにせよ cell-cycle の中の cyclic-cells は混乱を来す。巨細胞や核異常細胞が出現することは容易に推定される。

以上で核異常や巨細胞、2核細胞や多核細胞の出現すること、中層細胞に増殖因子が関与して核分裂が起こり、分化した細胞のため細胞質分離が不能で2核細胞が発生することなどの異常細胞の形成理論が完成する。

次に残された問題は、このウイルスが分化傾向のある中層細胞や表層細胞を必要とする理由を明らかにし、その理論を確立することである。

明らかに HPV 感染部位の近傍の細胞を角化させる角化異常を認めている。これらの細胞は中層細胞が小型化し、染色態度も赤く角化傾向を示し、核は濃縮してやがては核破碎に陥り、死滅する。実にウイルスが誘導、促進するといわれるアポトーシス (apoptosis) に酷似している。

HPV による癌化の可能性

HPV の中でも癌ウイルスといわれている Type 16 や Type 18 の子宮頸癌患者における感染率を dot hybridization 法で調べたところ、Type 16-family 71%、Type 18-family 19%、その他 1% であり合計 91% の感染率であった (厚生省がん研究評価委員会資料)。

子宮頸癌の発癌は多段階発癌説がいわれており、原因のすべてが明らかになったわけではない。

しかし、HPV が産生する E₆蛋白や E₇蛋白がアミノ酸レベルで各遺伝子蛋白と結合することによって起こる増殖抑制系の異常、増殖促進系の異常は、他の染色体にも異常を起こしているのかも知れない。例えば 3 番の染色体の短腕の欠失が報告されているが、その部分に重要な増殖抑制遺伝

子があるのかも知れない。

また、18番の染色体の c-myc 癌遺伝子の近傍に HPV 粒子が多数入り込んでいることが証明されており、それが c-myc 癌遺伝子の増幅を促すともいわれる。

これまでに述べた HPV による細胞の変化においても、核異常の発生機転はよく理解されるが、癌化の基準、すなわち真の癌細胞の細胞学上の形態がいま一つ明瞭でない。

癌の定義を『無限増殖能と浸潤、転移』の細胞とするなら、決して変性が主役ではなく活発な良性細胞に似た細胞であろう。

細胞診は癌が生む周りの環境もよく反映してくれる。

HPV による異常細胞は細胞死に連なる変性細胞群であり、増殖果敢な細胞密度の高い悪性細胞群と大別して観察するのも一法である。

HPV 感染による細胞診所見

代表的な感染の証拠所見は koilocytosis 核周囲空洞である。近年、dyskeratosis 角化異常も HPV 感染の証拠所見と見做されており、次に重要な所見として中層細胞の核腫大と binucleation 2核形成を挙げている。これはウイルスの初期感染部位が重要な課題となる。

そのほか、multinucleation 多核、amphophilia 細胞質の混染、karyorrhexis 核破碎、giant-cell formation 巨細胞形成、bizarre-cell 奇怪細胞などの出現が特徴的である。

田中によると 2核形成が最も多く出現し 73% (110/150)、次いで dyskeratosis 角化異常 (parakeratosis を含む) 60% (90/150) であり、そして nuclear-smudging すりガラス様核 45% (67/150) の順位となっている。

著者の行った検討では 330 枚の標本において、最も多く出現した細胞所見は中層型核異常細胞 (主として核腫大) であり全体の 41.8% に及び、次に dyskeratosis 角化異常 26.9%、3 番目に 2核形成 20.6% となった。

上皮内細胞への影響とその変化は、ウイルスの初期感染部位に最も顕著であることは当然である。そこで HPV 感染が確かめられた患者の細胞

表1 宮城県における子宮癌検診の成績

年 代	30歳以上の 対象人口	受診率	発 見 率 (陽性者対比)		
			inv. Ca.	C.I.S	dysplasia
1961	376,500	0.2%	0	2(15.4%)	11(84.6%)
1965	421,900	5.4%	42(20%)	62(29.5%)	106(50.5%)
1970	466,400	9.5%	63(14.9%)	67(15.8%)	294(69.3%)
1975	519,800	16.9%	64(18.1%)	61(17.2%)	229(64.7%)
1980	585,900	20.4%	68(23.6%)	31(10.8%)	189(65.6%)
1985	646,100	25.1%	88(12.4%)	42(5.9%)	580(81.7%)
1990	693,800	28.3%	51(9.5%)	41(7.6%)	446(82.9%)

診標本330枚の中で表層, 中層, 旁基底層の3層を検索部位として990カ所の各細胞所見について検討した結果, すべての所見において中層における核異常所見が段凸に多いことが判明した。

そこで病理診断が中等度異形成であって, 中層型2核細胞が多出し, 旁基底型2核細胞のほとんど出ていない症例を選んで, 追跡調査したところ3カ月後にはすべての2核細胞が表層型に変わっていた。もし2核形成が旁基底層をスタートとして始まったものであれば, 3カ月後には中層型2核細胞も増えていなくてはならない。この1症例の事実は明らかに中層の細胞に初めて異変(2核)が起こったことを示している。

いろいろな核異常が中層型細胞に多く出現するということは, 細胞診の推定病変は軽度異形成である。

そしてこれらの細胞診所見も長期間追跡していると, そのほとんどが正常に戻ってしまうことが分かった。

軽度異形成 mild dysplasia

子宮頸癌の検診を行うと, 最も多く発見される病変は異形成である。

わが国で早くから癌検診を熱心に施行してきたのは宮城県であるが, その1例を示すと, 1961年より1990年にかけて行われた膨大な検診数の中で異形成の発見率は陽性者対比の50%から80%を占めており, いかに異形成が多いかが分かる(表1)。一方, 230人の軽度異形成の人を2~10年かけて追跡調査した結果, わずか15人(6.5%)が進行しただけであった。残りのうち46人(20%)が無変化,

残り169人(73.5%)が正常に戻ってしまった。無変化も加えらるとなんと93%強の人が進行しなかったことになる。

進行した15人(6.5%)の内訳をみると, 高度異形成に平均32カ月で5人, 上皮内癌に平均55カ月で8人, 微小浸潤癌に2~8年かけて2人移行していた。

伊藤によると HPV に感染した79人の病理組織像を検討した結果, 全体の58.2%(46人)が軽度異形成であり, 17.7%(14人)が中等度異形成, 16.5%(13人)が高度異形成, 3.8%(3人)が上皮内癌であり, 残り3.8%(3人)が炎症疾患であった。病理組織像においても細胞診の推定と同様に軽度異形成と中等度異形成が合わせて74.7%と最も多く出現した。

これらは初期の異形成が HPV の感染によるものであることを裏付けている。

新しい HPV 細胞診の見方の試み

1988年より1993年にかけて, HPV 感染者と認定した30人の細胞診と病理診断を合わせて平均2年8カ月追跡観察し, 軽度異形成であるが細胞診にほとんど所見がなく, あっても中層型核異常細胞くらいしか認められないグループをI群とし, 細胞診は常に Class IIIa から IIIb であり病理診断は軽度異形成から中等度異形成と診断されたグループをII群とし, 細胞診は Class IIIb から IV が出ており, 出現細胞の小型化が目立ち, 病理診断も高度異形成から上皮内癌と診断されたグループをIII群とした。その結果各群に出現する剥離細胞の特徴は表2に示す通りである。この分類法は,

表2 HPV 感染段階 (Step) の細胞診所見

		共通所見
Step-I	(HPV 感染 I 度) 角化異常 中層細胞の核異常	コイロサイトーシス
Step-II	(HPV 感染 II 度) 中層～表層細胞の 2 核 多核細胞(少数) 旁基底細胞の核異常 巨細胞形成	細胞質の混染性
Step-III	(HPV 感染 III 度) 旁基底細胞の 2 核 多核, 核破碎, 奇怪核 小型化細胞の出現 裸核化 集団細胞	化生細胞の出現

これまでの考察より HPV の感染段階とその剝離細胞所見を関連づけており各グループを感染段階の Step と見做し, Step I, II, III の細胞所見としてみると, Step I では, まず HPV 感染の証拠所見としての角化異常と中層型核異常細胞が始まる。Step II では中層から表層の 2 核細胞が増加し, 少数ながら旁基底細胞の核異常や巨細胞をみる。Step III では, 旁基底細胞の 2 核, 多核, 核破碎, 奇怪細胞などの多彩な細胞所見をみるが, 重要な点は細胞の小型化である。通常細胞診には基底細胞は出現しないといわれており, 出現する最小の扁平上皮細胞は旁基底細胞であって, 平均細胞径 20~40 μ m である。この場合出現する小型化した細胞の平均細胞径は 10~15 μ m 程度であって, reserve cell や basal cell を推定する。さらに病変が進行すると小型の裸核細胞 (cell cycle の M 期細胞) や上皮内癌の小型悪性細胞の集団 cluster をみる。

koilocytosis や amphophilia や化生細胞など

の出現は Step 特異性はなく, いつでも出現する。

まとめ

現代の婦人科細胞診の中で, 子宮頸部の異形成に関する考察では, HPV の感染による細胞変化を十分に考慮すべきである。

その最大の理由として, 近年目覚ましい進歩を遂げた分子生物学の手法と遺伝子構造の解明によって核異常細胞の発生の仕組みと癌化の理論が確立しつつある。故に核異常細胞と癌細胞を区別し得る段階に入っている。

そこで著者は次に挙げることを提起する。

1) HPV は細胞に核異常を喚起するが, その始まりは上皮の中層であり, いずれは成熟によって排除される。

2) 中層の核異常は HPV 感染による一連の変化であっても癌化もしくは前癌病変ではない。

3) 癌化すなわち無限増殖能を獲得する細胞は常に増殖因子の豊かな細胞であり, 上皮では stem-cell (reserve cell) であり, 細胞の異型の少ない小型細胞である。

4) 癌細胞と核異常細胞は分けて考える。

5) 以上の諸点より異形成の grading は, 深層から表層に向かう分化傾向によるのではなく, 表層から深層に向かって細胞の変化を確かめて分類すべきであり, 発想の逆転が必要である。

謝 辞

稿を終るにあたり, 久留米大学の田中博志先生, 多摩がん検診センターの伊藤良彌先生, 東京都がん検診センターの大村峯夫, 小田瑞恵両先生, 慈恵医大の佐々木寛先生などのご協力に感謝するとともにデータを使わせていただいた宮城県対がん協会とご助言いただいた東京大学病理の坂本穆彦先生に紙面を借りて感謝致します。

Synopsis

The points of this presentation are reform of the theory relating to "Dysplasia and Carcinogenesis" and the cytological methods. In 1976, Meisels and Fortin reported that dysplasia is the disease caused by Human papilloma virus (HPV), and surprisingly, intermediate cells infected by HPV possessed the ability of proliferation and mitosis, resulting in binucleation and multinucleation.

In cytology, dysplasia is thought to be delivered from basal cells and abnormal cells are differentiated from lower layer to upper layer, the grade of dysplasia is judged from the level of cell-differentiation. In histology, however, differentiated cells are thought to be normal cells from the histological definition. Therefore, the histological theory cannot explain the fact that the appearance of the abnormal cells from the all layers in cytology of the mild dysplasia. This discrepancy can be understood well if we think it is caused by HPV infection.

HPV (ds-DNA) can only proliferate using cellular factors. And as keratinocytes is important with relating to this proliferation, HPV affects human intermediate layer and upper layer. In HPV-infected cells, HPV-E6 protein and E7 protein can bind the products of p53 and pRB, suppressor genes, respectively. These lead to degradation of these proteins' function, acceleration of cell proliferation, and abnormality of cell-cycle time. Our fundamental theory of dyskaryosis is based on these findings. Mild dysplasia is transferred from intermediate layer to upper layer and vanish after cell maturation. Immortalization, transformation, and gene alteration are important factors for carcinogenesis. The deletion of chromosome 3p is one of the most important genetic changes during carcinogenesis.

On the basis of carcinogenesis theory described above, the cytological findings of HPV-infected cells are classified into three steps. Step I, early stage, is dyskeratosis and nuclear enlargements of intermediate cells. Step II, middle stage, is the increasing of binucleated cells from intermediate layer to upper layer, small number of parabasal cells with dyskaryosis, and giant cell formation. Step III, late stage, is binucleation, multinucleation, karyorrhexis, bizarre-cells, and many other findings of parabasal cells. Step III include two important findings.

1. appearance of small cells, 10–15 μ m in diameter
2. appearance of a cluster of small hyperchromatic cells

Finally, we should discriminate small cells identified as cancer cells, from differentiated dyskaryotic cell. And the stage of dysplasia should not be decided by the degree of cell differentiation from low layer to upper layer, but by the careful observation on the abnormal cells from upper layer to lower layer.
