

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592454

研究課題名(和文)子宮頸部扁平上皮癌およびLSIL・HSIL・ASCの核クロマチン分布の定量的解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of nuclear chromatin distribution in uterine cervical squamous cell carcinoma, LSIL, HSIL and ASCUS.

研究代表者

加来 恒壽(Tsunehisa, Kaku)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60185717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：細胞診断において、核クロマチンの所見は重要である。客観的評価のため核クロマチン分布を数値化する画像解析プログラムを開発した。クロマチン分布を核中心と核辺縁間のクロマチン濃度分布を直線とみなした場合の2点間の濃度差の傾き値(radial distribution(RD)value)として子宮頸部扁平上皮病変との関連を解析した。HSIL特に上皮内癌のRD値が最大であり、LSIL、HSIL、子宮頸部扁平上皮癌の平均RD値は統計学的に有意差が認められ、悪性度の判定基準として重要であり、RD自体が客観的評価法として有用であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The chromatin pattern of nuclei is one of the most important criteria for cytological diagnosis. The quantitative assessment of nuclear chromatin distribution using image analysis by computer was applied for objective classification for cervical squamous epithelial lesions. An image analysis program was developed as a plug-in macro program of an image processing software, ImageJ. The radial distribution (RD) value that represents the gradient of the staining intensity from the center to the edge of a nucleus was defined as an index of the chromatin distribution. The RD values of LSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion), HSIL (High grade squamous intraepithelial lesion) and squamous cell carcinoma were significantly difference among these three categories, and the RD value of HSIL was maximum. In the cervical squamous epithelial lesion, the RD value could be useful as an index for malignancy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：細胞診断学 子宮頸癌 子宮頸部異形成 核クロマチン ベゼスダ・システム 扁平上皮癌 LSIL HSI  
L

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸部細胞診において、悪性細胞・異常細胞の診断は核・細胞質の所見を総合的に評価して行われるが、特に核所見(核の大きさ・形状、核クロマチンの分布)は重要である。核の大きさ・形状は測定が可能であるが、核クロマチンの分布の異常は診断者の主観的判断により細顆粒状や粗顆粒状、不均等クロマチン分布、オイクロマチン、オペーク(曇った)状など、様々な表現が使用されている。多くが経験に基づくものであり、診断者内・診断者間での再現性が低く、客観性に欠けるという問題がある。

これまでクロマチン分布の客観化に関して様々な試みがなされている。Youngらはデジタル化した核の画素の濃度を計測し、その濃度の均一度を算出する方法を採用した(Cytometry 1986)。Tezukaらは、この方法を採用してクラスター分析を行い、子宮内膜細胞診断と病理組織診断との相関を得ている(Anal Quant Cytol Histol. 1990)。田中らはクロマチン・パターンをブロック数に計測し解析している(日臨細 2001)。Murataらは甲状腺腫瘍細胞を対象にして、クロマチン・パターンを解析し、良好な結果を得ている(Cytometry 2002)。最近では、クロマチン分布の解析にはその性状もさることながら、核内における3次元的位置も重要であることが報告されはじめている(Nature Rev Genet 2007, Thyroid 2007)。

我々は、子宮頸部腺癌などの腺系病変を有する症例の細胞診に出現する腺系細胞の形態学的解析を行ってきた(Cytopathology 2005)。さらに腺系細胞のクロマチン所見を客観化するためデジタルカメラで撮影した画像をコンピューター処理し、染色濃度を9段階に色調に分けてクロマチン分布図を作成し、Peripheral(P)型、Mixed(M)型、Central(C)型の3パターンに分け、病変の有無との関連性について検討し、核クロマ

チン分布が悪性度の判定基準として重要であること、クロマチン分布とDNA量との間に高い相関性を示すことを報告してきた(Acta Cytologica 2004)。

前記3つの核クロマチン分布パターンの出現する割合は、各病変において変化が見られ、下式で求められるMalignancy Index(MI)が上皮内腺癌以上の患者では有意に高くなる( $p < 0.05$ )ことも報告した(Acta Cytologica 2004)。

$$MI(\%) = \frac{\text{M,C 型の合計}}{\text{Total(P,M,C 型の合計)}} \times 100$$

しかし、MIを求める際に必要な核クロマチン分布パターンも、観察者の主観で判定するため、統計的な評価が困難であった。そこで、我々は核クロマチン分布を数値化する画像解析プログラムを開発し核クロマチン分布の定量化を行い、再現性・客観性を持たせることに取り組んでいる。

## 2. 研究の目的

これまで子宮頸部腺癌の細胞診断において、異常腺系細胞の核クロマチン分布に注目して定量的解析を行い、分布のパターンが悪性度と関連することを明らかにしてきた。

本研究では、子宮頸部扁平上皮癌およびベセスダ・システム2001に準拠したLSIL(Low-grade squamous intraepithelial lesion)、HSIL(High-grade squamous intraepithelial lesion)、ASC(Atypical squamous cells)などの類縁病変の2次元および3次元の核クロマチン分布の定量的解析とその細胞診断学的意義を明らかにし、さらに画像解析プログラムを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 子宮頸部扁平上皮癌およびLSIL、HSIL、ASCなどの類縁病変の細胞像の核クロマチン分布について NIH image により染色濃度

を 9 段階色調で分布図を作成し、Peripheral(P)型、Mixed(M)型、Central(C)型の 3 つに分け、病理学的病変との関連性について検討する。

(2) 画像解析法の開発による細胞像をデジタル化し、核中心からのピクセル値分布を計測し、ピクセル値分布の傾きを算出する定量的評価法を確立し、その細胞診断的意義を明らかにする。

(3) 核クロマチン量を PI (Propidium Iodide) 染色して測定し、核クロマチン分布との相関を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 平成 23 年度

子宮頸部扁平上皮癌および LSIL, HSIL, ASC などの症例を病理学的に分析して抽出し、細胞学的所見を検討した。これらの症例について計量的研究を行い 2 次元の核クロマチン分布の検討を行った。クロマチン分布を Peripheral (P) 型, Mixed (M) 型, Central (C) 型の 3 つに分け、Malignancy Index を求め、病変の有無との関連性について分析した。

核クロマチン分布を定量化する画像解析プログラム開発し、オープンソースとして利用できるように、プログラムによる解析方法を下記のように機能を充実・強化した。核中心から核辺縁へ向かうピクセル値分布を層状に計測し、核クロマチン分布を定量化し、ピクセル値分布の傾き (傾き値 radial distribution (RD) value) を計算する。すなわち、核中心から辺縁にかけて実測したピクセル値分布と回帰直線を作成し、核中心と核辺縁間の濃度分布を直線とみなした場合の 2 点間の濃度差を表している。検討対象の核クロマチン分布を Peripheral (P) 型, Mixed (M) 型, Central (C) 型を 3 つのパターンに分け、傾き値 (RD) value との関連を明らかにして、この成果 Quantitative image analysis of nuclear chromatin distribution for cytological diagnosis.

ActaCytologica 2011;55(5):455-9 として発表した。

また、この開発したプログラムを活用して第 52 回日本臨床細胞学会総会 (2011) において「細胞周期からみた核クロマチンの意義 臨床検体への応用を目指して」および「子宮頸部扁平上皮系病変における RD 法の有用性の検討」を発表した。

(2) 平成 24 年度

子宮頸部扁平上皮癌および LSIL, HSIL, ASC の細胞学的所見の検討と、計量的研究を引き続き行い 2 次元の核クロマチン分布のパターンの検討を行った。

開発した核クロマチン分布を定量化する画像分析プログラムをさらに充実・強化した。核中心から核辺縁へ向かうピクセル値分布を層状に計測し、ピクセル値分布の傾き (傾き値 radial distribution (RD) value) を計算し、RD 自体が客観的評価法として有用であることを明らかとした。

この RD 値を子宮頸部扁平上皮癌および LSIL, HSIL, ASC などの症例を対象に解析し、HSIL 特に上皮内癌の RD 値が最大であり、LSIL, HSIL、子宮頸部扁平上皮癌の平均 RD 値は統計学的に有意差が認められた。また、子宮頸部扁平上皮癌のみならず子宮頸部腺癌でも画像解析で RD 値、核面積、核中心点間距離、核小体数などを解析し、有用なパラメーターであることが明らかになった。膀胱癌でも診断的価値があり、その膀胱癌に対する化学療法の効果をみるパラメーターとして RD 自体の有用性の検討を始めた。培養細胞を用いた検討で増殖能および cell cycle 関連蛋白である p21、p27、pki67 の発現との関連についても測定を始めた。膀胱注入療法に伴う核クロマチン分布の経時的変化 - RD 療法と PMC 分類の比較を行い、成果の一部を第 53 回日本臨床細胞学会総会春期大会で発表した。子宮頸部腺癌でも RD 値が有用である結果が得られている。子宮内膜癌における癌周囲の化

生の出現について、臨床細胞学および臨床病理学的研究を行い、約 80%の症例で化生が出現しており、これらの成果は英文誌に受理され、子宮内膜癌および化生を対象に画像解析で RD 値、核面積、核中心点間距離、核小体などの計測を始めた。

(3)平成 25 年度

子宮頸部扁平上皮癌および LSIL, HSIL, ASC を対象として引き続き細胞学的所見の検討と、計量的研究を行い 2 次元の核クロマチン分布のパターンの検討を行った。

開発した核クロマチン分布を定量化する画像分析プログラムを活用し RD 自体が客観的評価法として有用であることを更に症例を増やし明らかとした。

子宮頸部腺癌でも画像解析で RD 値、核面積、核中心点間距離、核小体数など症例を追加して解析した。培養細胞を用いた検討で増殖能および cell cycle 関連蛋白である p21、p27、pki67 の発現との関連もみられた。膀胱癌の治療による核クロマチン分布の経時的変化を継続して研究している。

子宮に発生する atypical polypoid adenomyoma の臨床病理学的研究も英文誌に発表された。子宮内膜癌における癌周囲の化生の出現について、臨床細胞学および臨床病理学的研究を行い、約 80%の症例で化生が出現しており、各種化生の特徴を明らかにし、これらの成果は英文誌に発表され、子宮内膜癌および化生を対象に画像解析で RD 値、核面積、核中心点間距離、核小体などの計測を行った。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Toomine Y, Watanabe S, Ohishi Y, Tamiya S, Sugishima S, Kobayashi H, Oda Y, Kaku T, Endometrial metaplasia : correlation of histological and cytological specimens obtained from 103 cases undergoing hysterectomy for endometrial carcinoma. *Cytopathology*, 査読有, 25(2):2014,pp78-85  
DOI:10.1111/cyt.12055.  
Matsumoto T, Hiura M, Baba T, Ishiko O,

Shiozawa T, Yaegashi N, Kobayashi H, Yoshikawa H, Kawamura N, Kaku T, Clinical management of atypical polypoid adenomyoma of the uterus. A clinicopathological review of 29 cases. *Gynecol Oncol*, 査読有, 129(1):2013, pp54-7

DOI:10.1016/j.ygyno.2012.12.040

Tomoko Hagiwara, Tsunehisa Kaku, Hiroaki Kobayashi, Norio Wake, Toshiaki Saito, Well-Differentiated Villoglandular Adenocarcinoma of the Uterine Cervix:Assessment of Cytological Features by Histological Subtypes. *Acta Cytologica*, 査読有, 57: 2013, pp61-68

DOI:10.1159/000342917

Yoshihiro Ohishi, Shuichi Kurihara, Murasaki Aman, Tadahisa Takeuchi, Hiroko Imamura, Tsunehisa Kaku, Hiroaki Kobayashi, Norio Wake, Yoshinao Oda, "Piling up"clea cells in müllerian-type mucinous and mixed cell-type borderline tumor do not represent concomitant clear cell neoplasms. *Human Pathology*, 査読有, 43 : 2012, pp1618-1626

DOI: 10.1016/j.humpath.2011.11.019

Yoshihiro Ohishi, Shuichi Kurihara, Tadahisa Takeuchi, Murasaki Aman, Tsunehisa Kaku, Hiroaki Kobayashi, Norio Wake, Yoshinao Oda, E-cadherin nuclear staining is useful for the diagnosis of ovarian adult granulosa cell tumor. *Human Pathology*, 査読有, 43 : 2012, pp808-817

DOI:10.1016/j.humpath.2011.07.018

仲 正喜、大久保文彦、渡邊壽美子、田宮貞史、加来恒壽、杉島節夫、山元英崇、小林裕明、小田義直、子宮頸部細胞診における fiber cell の意義、日本臨床細胞学会雑誌、査読有、50(4): 2011, pp209 - 213  
Jingu R, Ohki M, Watanabe S, Tamiya S, Sugishima S, Kaku T, Quantitative Image Analysis of Nuclear Chromatin Distribution for Cytological Diagnosis. *Acta Cytologica*, 査読有, 55 : 2011, pp455-459

DOI:10.1159/000330672

Takatsu A, Shiozawa T, Miyamoto T, Kurosawa K, Kashima H, Yamada T, Kaku T, Mikami Y, Kiyokawa T, Tsuda H, Ishii K, Togashi K, Koyama T, Fujinaga Y, Kadoya M, Hashi A, Susumu N, Konishi I, Preoperative Differential Diagnosis of Minimal Deviation Adenocarcinoma and Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia of the Uterine Cervix. *Int J Gynecological Cancer*. 査読有, 21(7) : 2011, pp287-1296.

DOI:10.1097/IGC.0b013e31821f746c

[学会発表](計 19件)

園田顕三、小林裕明、矢幡秀昭、野上美和子、大久保文彦、仲正喜、山元英崇、浅野間和夫、奥川馨、兼城英輔、河野善明、大神達寛、八木裕史、権丈洋徳、小田義直、加来恒壽、加藤聖子、特徴的な細胞診所見を呈した子宮頸部明細胞腺癌の一例、第29回日本臨床細胞学会九州連合会学会、2013年7月27日、九州大学医学部百年講堂  
奥井馨、小林裕明、権丈洋徳、長山利奈、八木裕史、兼城英輔、河野善明、矢幡秀昭、園田顕三、加来恒壽、内田聡子、福嶋恒太郎、加藤聖子、子宮頸部摘出術後に分娩に至った3症例の検討(吻合部周囲静脈瘤に着目して)、第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2013年7月20日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA

仲正喜、渡邊壽美子、加来恒壽、大石善文、田宮貞史、大久保文彦、小田義直、横山正俊、岩坂剛、杉島節夫、培養細胞を用いたpair cells生成に関する検討、第54回日本臨床細胞学会総会春期大会、2013年6月1日、グランドプリンスホテル新高輪

Sumiko Watanabe, Tsunehisa Kaku, Masafumi Ohki, Sadafumi Tamiya, Setsuo Sugishima, Setsubo Murata, Yoshihiro Ohishi, Masatoshi Yokoyama, Yoshiko Kashimura, Masamichi Kashimura, Tsuyoshi Iwasaka, Correlation between nuclear chromatin pattern and cell cycle.18th INTERNATIONAL CONGRESS OF CYTOLOGY, 2013年5月26日~30日, PALAIS DES CONGRES(FRANCE PARIS)

長山利奈、小林裕明、権丈洋徳、八木裕史、兼城英輔、河野善明、奥川馨、矢幡秀昭、園田顕三、加来恒壽、加藤聖子、抵抗性再発ミューラー管がんに対するジェムシタピン単剤化学療法の見直し、第65回日本産科婦人科学会学術講演会、2013年5月12日、札幌プリンスホテル

兼城英輔、小林裕明、河野善明、権丈洋徳、八木裕史、長山利奈、奥川馨、矢幡秀昭、園田顕三、加来恒壽、加藤聖子、シラートによる子宮頸部異形成の組織学的に変性に関する検討、第65回日本産科婦人科学会学術講演会、2013年5月11日、札幌プリンスホテル

河野善明、八木裕史、権丈洋徳、大神達寛、兼城英輔、奥川馨、浅野間和夫、矢幡秀昭、園田顕三、加来恒壽、小林裕明、加藤聖子、遠隔転移を有する子宮頸癌に対する初回治療について、第65回日本産科婦人科学会学術講演会、2013年5月11日、札幌プリンスホテル

小林裕明、長山利奈、井上貴史、兼城英輔、河野善明、奥川馨、矢幡秀昭、園田顕三、加来恒壽、和氣徳夫、術前と術中の情報からリンパ節郭清を省略できる子宮体癌症例をどの程度抽出できるかに関する検討、

第52回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2012年7月19日、グランドプリンスホテル高輪

小林裕明、井上貴史、小川伸二、福嶋恒太郎、兼城英輔、河野善明、奥川馨、矢幡秀昭、園田顕三、加来恒壽、妊娠に合併した子宮頸がんの取り扱い-自験例も含めて-、第9回婦人科がん会議、2012年6月6日、長島温泉ホテル花水木

渡邊壽美子、加来恒壽、田宮貞史、杉島節夫、大喜雅文、坂梨史典、山口将太、鷺山和幸、金城満、岩坂剛、膀胱注入療法に伴う核クロマチン分布の経時的変化-RD療法とPMC分類の比較-、第53回日本臨床細胞学会総会春期大会、2012年6月3日、幕張メッセ国際会議場

遠峯由希恵、渡邊壽美子、田宮貞史、杉島節夫、小林裕明、小田義直、加来恒壽、子宮内膜癌症例に出現した扁平上皮への分化を示した細胞の細胞像と病理学的所見の検討、第53回日本臨床細胞学会総会春期大会、2012年6月2日、幕張メッセ国際会議場

矢幡秀昭、麻生桂愛、八木裕史、井上貴史、兼城英輔、河野善明、奥川馨、園田顕三、加来恒壽、小林裕明、和氣徳夫、3mm以下の頸部間質浸潤に留まる子宮頸部腺癌b1期の術式は単純子宮全摘出術で十分か、第64回日本産婦人科学会学術講演会、2012年4月15日、神戸ポートピアホテル

上原俊貴、渡邊壽美子、田宮貞史、西村和徳、加来恒壽、中尾佳史、横山正俊、岩坂剛、杉島節夫、細胞周期からみた核クロマチン分布の検討、第52回日本臨床細胞学会総会春期大会、2011年5月22日、福岡国際会議場

遠峯由希恵、加来恒壽、渡邊壽美子、田宮貞史、杉島節夫、小林裕明、小田義直、子宮内膜癌における同一症例の組織像と組織像の比較検討 化生細胞に注目して-、第52回日本臨床細胞学会総会春期大会、2011年5月21日、福岡国際会議場

山口将太、渡邊壽美子、金城満、鷺山和幸、坂梨史則、田宮貞史、神宮綾多郎、大喜雅文、加来恒壽、杉島節夫、膀胱注入療法に伴う核クロマチン分布の経時的変化-RD療法とPMC分類の比較検討-、第52回日本臨床細胞学会総会春期大会、2011年5月21日、福岡国際会議場

西野彩、渡邊壽美子、田宮貞史、加来恒壽、小田義直、大久保文彦、小林裕明、和氣徳夫、大喜雅文、杉島節夫、子宮扁平上皮系病変におけるRD法の有用性の検討、第52回日本臨床細胞学会総会春期大会、2011年5月22日、福岡国際会議場

釣本美沙貴、渡邊壽美子、田宮貞史、西村和徳、鷺山和幸、金城満、加来恒壽、横山正俊、岩坂剛、杉島節夫、培養細胞を用いた核DNAロケーションとPap染色性の比較検討、第52回日本臨床細胞学会総会春期

大会、2011年5月21日、福岡国際会議場  
渡邊英理子、渡邊壽美子、田宮貞史、西村  
和徳、鷺山和幸、金城満、加来恒壽、横山  
正俊、岩坂剛、杉島節夫、Pap 染色におけ  
る核所見と核 DNA 量の比較検討、第 52 回  
日本臨床細胞学会総会春期大会、2011年5  
月21日、福岡国際会議場

渡邊壽美子、加来恒壽、田宮貞史、鷺山和  
幸、金城満、杉島節夫、小林裕明、中尾佳  
史、横山正俊、岩坂剛、細胞周期からみた  
核クロマチンの意義 臨床検体への応用  
を目指して -、第 52 回日本臨床細胞学会  
総会春期大会、2011年5月22日、福岡国  
際会議場

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

加来 恒壽 (KAKU, Tsunehisa)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：6 0 1 8 5 7 1 7

### (2)研究分担者

大喜 雅文 (OHKI, Masafumi)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：1 0 1 6 0 4 4 1

小林 裕明 (KOBAYASHI, Hiroaki)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：7 0 2 6 0 7 0 0

杉島 節夫 (SUGISHIMA, Setsuo)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：5 0 3 8 0 3 8 2

渡邊 壽美子 (WATANABE, Sumiko)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：9 0 4 0 4 0 8 7