

Acridine orange 螢光染色による尿細胞診

市 川 碩 夫
信州大学医学部泌尿器科学教室
(主任: 小川秋實教授)

Acridine Orange Fluorescence Microscopy for Urinary Cytology

Sekio ICHIKAWA

Department of Urology, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Akimi OGAWA)

The usefulness of acridine orange fluorescent staining for urinary cytology was evaluated. The urine sediments obtained from 110 patients with urinary tract malignancy, 19 patients with non-malignant urinary disease and 11 healthy adults were examined with acridine orange fluorescent staining according to Bertalanffy's method. The results were compared with those of Papanicolaou's staining done immediately after the fluorescent examination. Positive fluorescence occurred in 86% of the patients with bladder carcinoma (86 cases), 80% with renal pelvic and ureteral carcinoma (10 cases), 29% with renal cell carcinoma (7 cases) and 29% with prostatic carcinoma (7 cases). Seven per cent of the patients showed false positive fluorescence. The patients with bladder carcinoma of high grade, high stage, large size or multiple occurrence revealed higher rates of positive fluorescence. The positive rates of fluorescence were much the same as those of Papanicolaou's staining and there was a good correlation between the two. These results lend support to the clinical usefulness of acridine orange fluorescent staining in urinary cytology.

Shinshu Med. J., 31 : 417-421, 1983

(Received for publication May 28, 1983)

Key words : urinary cytology, fluorescence microscopy, nucleic acid

尿細胞診, 螢光顕微鏡, 核酸

I 緒 言

尿路上皮腫瘍の早期診断のために、尿細胞診の占める位置は大きい。しかし、悪性腫瘍か否かの判定には熟練を要する。もし、この判定が容易にできるならば、集団健診にも利用できることになり、尿細胞診の有用性は高まる。

Acridine orange は細胞内の核酸と特異的に結合して蛍光を発するが、核酸量に応じて蛍光度と色調を変えることが知られている¹⁾⁻³⁾。Bertalanffy³⁾は、この方法をおもに子宮頸癌の細胞診に応用し、臨床的

意義のあることを報告した。その後尿細胞診にも応用され³⁾⁻⁵⁾、本邦では辻ら⁶⁾が本法の有用性を報告している。著者はこの方法を追試し、臨床的意義を再確認したので報告する。

II 方 法

A 対象患者

1965年から4年間に信大病院泌尿器科で診療した尿路悪性腫瘍患者110名、悪性腫瘍以外の尿路疾患患者19名、および正常者11名を対象とした。尿路悪性腫瘍患者の内訳は、腎細胞癌7名、腎盂または尿管腫瘍10

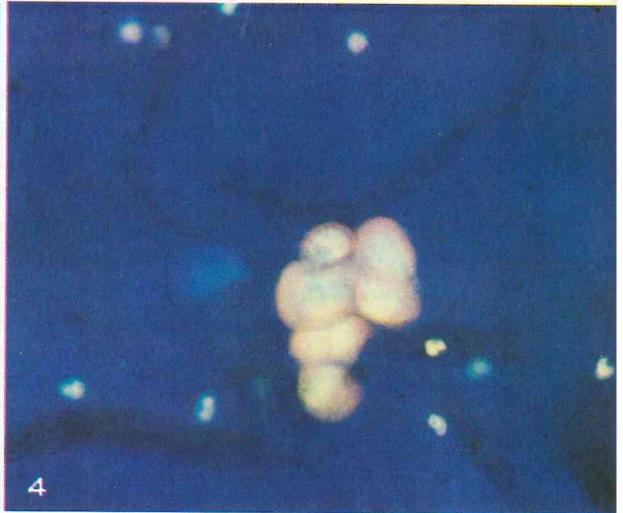
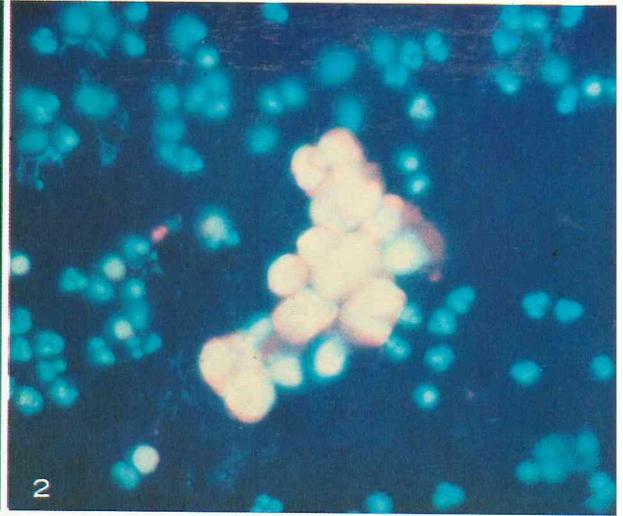
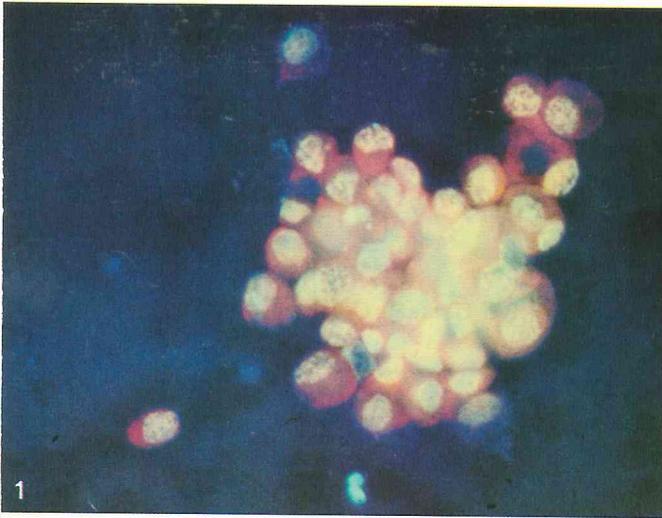


Fig.1 Urine sediment from a patient with bladder tumor. A cluster of epithelial cells is seen with bright yellow nuclei and brick-colored or brilliant red cytoplasm, (acridine orange stain)

Fig.2 Urine sediment from a patient with bladder tumor. A cluster of epithelial cells is seen with large yellow nuclei and red cytoplasm. White blood cells scattered around appear yellow, (acridine orange stain)

Fig.3 Urine sediment from a patient with congenital hydronephrosis. Epithelial cells show pale yellow or bright green nuclei and pale red cytoplasm, (acridine orange stain)

名、膀胱腫瘍86名、前立腺癌7名であり、悪性腫瘍以外の尿路疾患患者の内訳は、前立腺肥大症術後膀胱炎10名、腎結石3名、腎出血3名、嚢胞腎2名、先天性水腎症1名であった。

B 標本作製法

診断確定後で、治療開始前の自排尿を採取して検査に供した。なお、一部の患者では、尿管カテーテル法で採取した尿尿について検査を行った。

採集した尿を以下の順に処理して標本を作製した。

1) 1,500回転、5分間遠沈し、沈渣をスライドグラスに塗抹、室温乾燥。

2) 95%エチルアルコールとジエチルエーテルの等量混合液で15分間固定。

3) 80%アルコール、70%アルコール、50%アルコール、蒸溜水へ順次約10秒ずつ浸漬。

4) 1%醋酸へ約10秒、次いで蒸溜水へ約10秒浸漬。

5) 0.01% acridine orange 液で3分間染色、続いてPH6磷酸緩衝液で1分間脱色。

6) 0.1M 塩化カルシウム液へ1分30秒間浸漬、続いてPH6磷酸緩衝液で洗い、濡れているまをカバーグラスで覆った。

7) 標本作製後5ないし20分で鏡検を行い、終了後カバーグラスを外し、50%アルコールに10分浸漬、脱色してPapanicolaou 染色を型のごとく施し、検査を行った。

C 鏡検方法

蛍光顕微鏡装置として光源は超高圧水銀灯 AHL 250 UV (オリンパス)、励起フィルターはBG₁、BG₁₃、接眼フィルターはFY₃、を使用した。

沈渣中にみられる上皮細胞の数個以上の集団の蛍光色(以下蛍光度と記す)の強弱に細胞の形態的所見を加味して以下のごとく三分した。

1) 陽性

細胞質および核小体がオレンジ色ないしレンガ色の、核は黄緑色ないし黄色の蛍光を発生し、悪性細胞にみられる形態的变化を示すもの (Fig. 1, 2)。

2) 疑陽性

蛍光は陽性例より一般に弱くなり、細胞質、核小体は薄赤色、核は緑色に近づき、悪性細胞が疑われる形

態的变化を示すもの (Fig. 3, 4)。

3) 陰性

細胞質、核小体はほとんど蛍光を発生せず、背景の濃青色ないし薄赤を呈し、核は薄黄色の蛍光を発生し、悪性細胞を疑わせる形態的变化のないもの (Fig. 5)。

なお、尿沈渣中に蛍光を発生するものとして白血球、細菌があり、白血球は核が黄白色の蛍光を発生し、細菌はレンガ色の蛍光を発生するが、形態的に鑑別は容易で、上皮細胞の蛍光判定に支障になることはなかった。

III 結 果

全例の蛍光度別の成績を Table 1 に示す。尿路上皮腫瘍では陽性率が高く、腎細胞癌、前立腺癌では陽性率が低かった。非悪性腫瘍では、嚢胞腎の2例が陽性、腎出血、術後膀胱炎、先天性水腎症の各1例で疑陽性であった。膀胱癌に限って、grade, stage (膀胱癌取扱規約による)、大きさ(母指頭大以下とそれ以上)、単発か多発か、あるいは形態による陽性率をみても Table 2 に示すごとく grade の高いもの、stage の高いもの、腫瘍の大きいもの、多発のものに有意に高い陽性率を示したが、腫瘍の形態による差はみられなかった。

Papanicolaou 染色による悪性度と蛍光度との関係を Table 3 に示す。尿路悪性腫瘍の全例で Papanicolaou 染色による悪性度と蛍光度は一致し、非悪性腫瘍症例のうち蛍光度が陽性の2例は Papanicolaou 法で疑陽性、蛍光度が疑陽性の3例は Papanicolaou 法で陰性であった。

IV 考 按

細胞診における悪性細胞の判定は、通常は核の増大、濃染、多形性、クロマチンの粗大凝集、核小体の肥大など悪性細胞の形態的变化を目やすに行われている。そのため、この判定には熟練を要する。Acridine orange 蛍光染色は、悪性細胞における核酸合成の亢進が蛍光を増強することを利用したもので、悪性細胞の検出が容易である³⁾⁴⁾⁶⁾⁹⁾。すなわち、核のDNAは量に応じ緑色から黄緑色、黄色に変わり、核と細胞質のRNAは量に応じ赤褐色からオレンジ色、鮮紅色

Fig. 4 Sediment of renal urine obtained by ureteral catheterization from a patient with congenital polycystic kidney. Epithelial cells have pale yellow nuclei and orange cytoplasm. (acridine orange stain)

Fig. 5 Urine sediment from a healthy adult. Nuclei of epithelial cells are pale yellow, but the cytoplasm is not tinged with fluorescence. (acridine orange stain)

Table 1 Fluorescence in disease groups

Disease	No. of patients	Fluorescence		
		+	±	-
renal cell carcinoma	7	2 (29)	0	5 (71)
renal pelvic carcinoma or ureteral carcinoma	10	8 (80)	0	2 (20)
bladder carcinoma	86	74 (86)	0	12 (14)
prostatic carcinoma	7	2 (29)	0	5 (71)
non-carcinomatous disease and healthy adult	30	2 (7)	3 (10)	25 (83)

Table 2 Fluorescence according to the parameters of bladder tumor

Parameters	Positive fluorescence (%)	
grade		
0-1	30/41	(73)
2-3	43/44	(98)
stage		
Ta-T1	34/45	(76)
T2-T3	39/40	(98)
size		
small	21/32	(66)
large	53/54	(98)
number		
solitary	39/49	(80)
multiple	35/37	(95)
form		
papillary	66/77	(86)
non-papillary	8/9	(89)

に変わる。濃青の背景に蛍光を発する細胞を発見することには特別な熟練を要さない。

Acridine orange 蛍光染色による細胞診をPapanicolaou 染色によるそれと比較した報告は多数あり³⁾⁴⁾⁷⁾⁹⁾、ほとんどが婦人科領域の報告であるが、両者の成績はほぼ同じである。ただし白血球や赤血球を多数混じたスミアでは、Papanicolaou 法では形態的評価はできないが、acridine orange 法では悪性細胞を発見できるという意見がある⁷⁾。Umiker⁵⁾ は、尿細胞診で両者を比較し、尿路上皮腫瘍での陽性率はほとんど等しいと報告している。著者の成績でも両者の成績はほぼ完全に一致している。Papanicolaou 法による

Table 3 Correlation between the fluorescence and Papanicolaou's classification

Classification by Papanicolaou's staining	Fluorescence		
	+	±	-
IV, V	86	0	0
III	2	0	0
I, II	0	3	49

尿細胞診で陽性率が高いのは、尿路上皮腫瘍の場合であって、腎実質腫瘍や前立腺癌では陽性率が低い⁶⁾、acridine orange 蛍光染色でも同じ結果である⁵⁾。これは悪性細胞の尿中への剝離遊出の多寡に関係することで、当然ともいえる結果である。

尿路上皮腫瘍のうち、膀胱腫瘍については、悪性度、浸潤度、腫瘍の大きさ、などと細胞診陽性率の関係が論じられているが、一般に悪性度の高いもの、浸潤度の高いもの、大きいものに陽性率が高いとされている¹⁰⁾¹¹⁾。著者の成績もこれに一致し、さらに単発腫瘍よりも多発腫瘍に陽性率が有意に高いという結果がえられた。

Acridine orange 蛍光染色の弱点は炎症などで核酸合成の亢進している細胞も強い蛍光を発するため、誤陽性 (false positive) が少なくないことである。Umiker⁴⁾ は非癌患者からの 410 検体を本法で検査して陽性 1%、疑陽性 12%であったと報告している。自験例の非癌患者では陽性 2 例 (7%)、疑陽性 3 例 (10%)、であったが、陽性の 2 例はいずれも嚢胞腎患者

で、しかも尿管カテーテル法で採取した腎尿についてである。従来、尿管カテーテル法で採取した尿には、腫瘍細胞と誤りやすい正常細胞が認められるとされているので¹²⁾、そのためかも知れない。疑陽性の3例は術後膀胱炎、腎出血、先天性水腎症であったので、炎症に基づく蛍光増強であったと考えられる。

Acridine orange 蛍光染色の弱点としてさらにあげられるのは、高度に変性した悪性細胞は蛍光を発しないことであり、そのため誤陰性 (false negative) が起こることである。自験例では、尿路上皮腫瘍の15%は陰性であったが、この一部は誤陰性であった可能性がある。これらの誤陽性、誤陰性は、比率はやや低いが Papanicolaou 法でも認められ、Umiker⁴⁾ は誤陽性0.5%、誤陰性4.3%と報告している。誤陽性、誤陰性は現状の細胞診では不可避なものといわざるをえない。

蛍光染色では形態的所見を十分に取ることはできないし、また蛍光が時間とともに減衰するので永久標本

にならない。このことが本法の普及しない原因であろう。しかし、誤陽性や誤陰性が若干多いにしろ、専門的熟練を要さずに悪性細胞のスクリーニングができるということは、集団健診への応用の可能性を示唆している。

V 結 語

Acridine orange 蛍光染色による尿細胞診を、Papanicolaou 染色による尿細胞診と比較検討したところ、ほぼ同等の陽性率がえられ、悪性細胞のスクリーニングが容易なことから、臨床的有用性が確認された。

本論文の要旨は、日本泌尿器科学会第30回東部連合総会 (1965年10月、松本) において発表された。

稿を終るにあたり、終始懇篤なる御指導、御校閲を賜りました小川秋實教授および御協力いただいた柳沢温講師に深く感謝致します。

文 献

- 1) Strugger, S. : Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. and H. Schaper. Hannover, 1949
- 2) 野田 定, 成瀬晴悦, 伊藤泰二 : 紫外線膀胱鏡による膀胱腫瘍の診断に関する研究—特に発色蛍光色調の由来について—. 泌尿紀要, 18 : 715-723, 1972
- 3) Bertalanffy, F. D. : Evaluation of the acridine-orange fluorescence microscope method for cytodagnosis of cancer. Ann NY Acad Sci, 93 : 715-750, 1962
- 4) Umiker, W. O. : Cytologic diagnosis of carcinoma of the urinary bladder by fluorescence microscopy. Acta Cytol (Baltimore), 5 : 245-249, 1961
- 5) Umiker, W. : Accuracy of cytologic diagnosis of cancer of the urinary tract. Acta Cytol (Baltimore), 8 : 186-193, 1964
- 6) 辻 一郎, 黒田一秀, 佐藤昭策, 平林良登 : acridine orange 蛍光染色による尿路腫瘍細胞診. 診と療, 56 : 153-157, 1968
- 7) Törnberg, B., Westin, B. and Norlander, A. : Fluorescence microscopy and acridine-orange staining in the cytological diagnosis of atypical changes in cervical epithelium. Acta Obstet Gynecol Scand, 39 : 517-527, 1960
- 8) Sussman, W. : Detection of gynecologic cancer by fluorescence microscopy. Obstet Gynecol, 13 : 273-277, 1959
- 9) Singh, M., Baveja, R., Singh, G. and Mehrotra, T. N. : Comparative study of fluorescent and Papanicolaou's techniques for detection of carcinoma of cervix uteri. Indian J Med Res, 64 : 1783-1787, 1976
- 10) 村山鉄郎, 近藤猪一郎, 松岡規男, 早淵洋子 : 尿路悪性腫瘍における尿細胞診の検討—膀胱腫瘍を中心として—. 泌尿紀要, 21 : 911-916, 1975
- 11) 長田尚夫, 井上武夫, 田中一成, 工藤 治, 吉尾正治, 黒子幸一 : 尿細胞診の検討. 西日泌尿, 42 : 543-547, 1980
- 12) Koss, L. G. and Durfee, G. R. : Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. 1st ed., Lippincott, Philadelphia, 1961

(58. 5. 28 受稿)