

Fig. 3. A, LI of PPAR γ . Immunoreactivity of PPAR γ was significantly higher in endometrial hyperplasia and normal endometrium in secretory phase (*, $P < 0.05$) than in endometrial carcinoma and normal endometrium in proliferative phase. Bars, SE. B, semiquantitative real-time reverse transcription-PCR for PPAR γ in the endometrial carcinoma and normal endometrial tissue. Expression of PPAR γ mRNA was significantly higher in proliferative-phase and secretory-phase endometrium than in endometrial carcinoma. *, $P < 0.05$. Bars, SD of triplicate samples.

PPAR γ LI was significantly correlated with p21 LI ($P < 0.0001$). BMI in endometrial carcinoma patients was significantly associated with PPAR γ LI of their carcinoma cells ($P < 0.0001$). No significant associations were detected between PPAR γ

Table 2. Correlation between PPAR γ immunoreactivity and clinical variables in endometrial carcinomas

Factor	N = 103	PPAR γ immunoreactivity		P
		+	-	
Age				
<50	20	14	6	0.5806
≥ 50	83	53	30	
Stage				
I + II	78	48	30	0.1869
III + IV	25	19	6	
Grade				
1 + 2	81	49	32	0.0629
3	22	18	4	
BMI* (median)	24.6	24.2	24.9	<0.0001 [†]
p21 (median)	7.0	9.0	5.0	<0.0001 [†]
ER α (median)	23.0	20.5	26.0	0.757 [†]
ER β (median)	5.0	10.5	4.0	0.1495 [†]
PR (median)	25.0	26.5	21.0	0.2313 [†]
Ki-67 (median)	32.0	30.0	36.0	0.969 [†]

Abbreviations: ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.
^{*}N = 101.
[†]Compared with PPAR γ LI.

immunoreactivity and overall survival ($P = 0.6367$) or disease-free survival of the patients ($P = 0.1168$; data not shown).

Real-time PCR analysis. We examined the expression of PPAR γ mRNA in 28 endometrial carcinoma patients and 14 normal controls. PPAR γ mRNA was abundantly expressed in secretory endometrium. There were significant differences between endometrial carcinoma and proliferative-phase tissues ($P = 0.0115$) or secretory-phase tissues ($P = 0.0217$; Fig. 3B), but no significant differences were detected between proliferative-phase and secretory-phase endometrium. In carcinoma cell lines, PPAR γ mRNA was also expressed in Ishikawa, Sawano, and RL95-2 cells (Fig. 4A). It is well known that PPAR γ heterodimerizes with RXRs, and we therefore examined the expression of RXRs-RXR α , β , and γ -mRNAs in these cells. These mRNAs were also expressed in Ishikawa, Sawano, and RL95-2 cells (data not shown).

Immunoblotting. Immunoblotting analysis was done using Ishikawa, Sawano, RL95-2, and MCF-7 cells to detect the presence of PPAR γ protein. MCF-7 cells were used as a positive control. Immunoreactive bands corresponding to PPAR γ were detected in all carcinoma cell lines (Fig. 4B).

Cell proliferation assay and apoptosis analysis. We examined the effects of naturally occurring PPAR γ ligand on the cell growth *in vitro* (Fig. 5A-C). 15d-PGJ₂ markedly suppressed cell growth in Ishikawa, Sawano, and RL95-2 cells in both dose- and time-dependent manners. In all three cell lines,

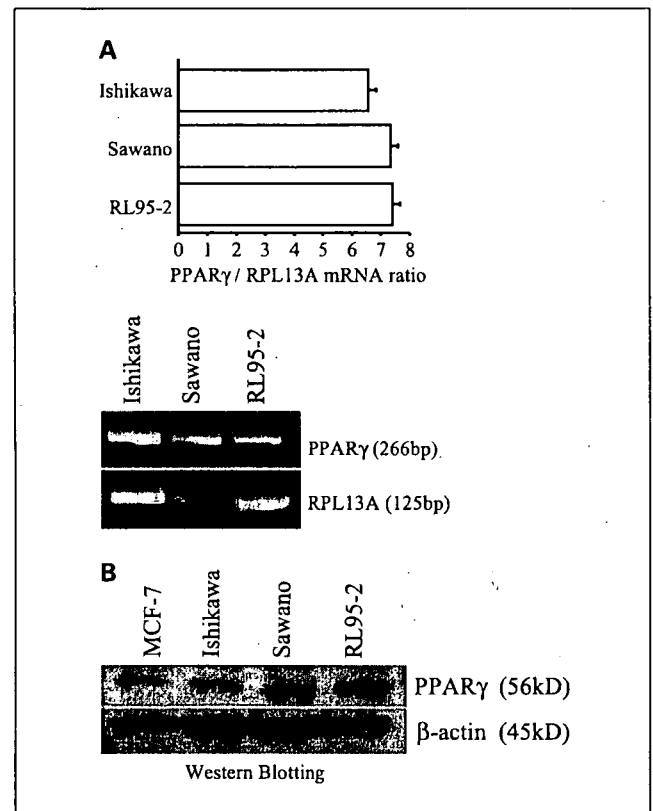


Fig. 4. A, semiquantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of PPAR γ in endometrial carcinoma cell lines. Bars, SD of triplicate samples. Agarose gel pictures show PPAR γ mRNA. B, results of Western blotting of carcinoma cell lines. MCF-7 was used as a positive control and β -actin was used as an internal positive control.

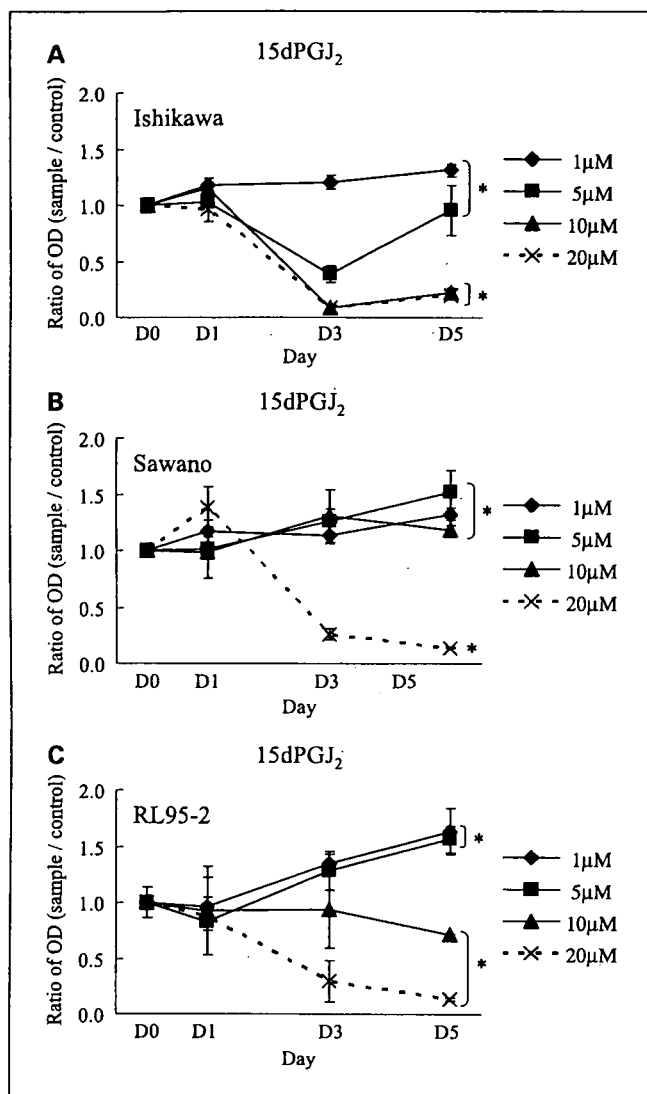


Fig. 5. Effect of 15d-PGJ₂ on the proliferation of (A) Ishikawa, (B) Sawano, and (C) RL95-2 cells. The concentrations of ligand are 1, 5, 10, and 20 μmol/L. Values are fold of the control absorbance. Points, mean of triplicate wells; bars, SD. *, $P < 0.05$. OD, absorbance.

growth suppression was detected after 3 days of the 15d-PGJ₂ addition.

We also examined the status of apoptosis after adding 15d-PGJ₂. Apoptosis indexes of Ishikawa, Sawano, RL95-2 cells were not significantly altered under 10 and 20 μmol/L 15d-PGJ₂ treatments for 5 days (Fig. 6A-C).

The expression of p21 mRNA after 15d-PGJ₂ treatment was summarized in Fig. 7A to C. The p21 mRNA expression increased in both dose- and time-dependent manners.

Discussion

In our present study, weak PPAR γ immunoreactivity was detected in endometrial carcinoma tissues. PPAR γ mRNA expression in carcinoma tissues was also lower than that in normal tissues. Similar results have also been reported in

esophageal (26) and lung (27) carcinomas. Normal human ureter also expressed PPAR γ protein, but there was a significant loss of PPAR γ expression in high-grade transitional cell carcinomas (28). Therefore, the results of our study are also consistent with these results, which support the hypothesis that the PPAR γ gene is a tumor suppressor gene, and dysfunction of PPAR γ contributes to tumorigenesis (11). However, several studies also showed that PPAR γ expression was more marked in carcinoma tissues than in normal tissues in several types of human malignancies. For instance, Zhang et al. analyzed 56 specimens of normal ovary and neoplasm using immunohistochemistry (29). Immunoreactive PPAR γ was not detected in normal ovaries. However, PPAR γ immunoreactivity in ovarian tumor tissues was significantly higher than in normal ovaries and benign ovarian tumors (29). Ikezoe et al. examined the expression of PPAR γ in 339 clinical samples and 71 various cancer cell lines, including colon cancer, breast cancer, prostate cancer, lung cancer, osteosarcoma, glioblastoma, and leukemia. All of the cell lines and clinical samples expressed PPAR γ as detected by real-time PCR and/or Western blot, but their expression levels varied widely among samples (30). Therefore, the results above indicated that the expression of PPAR γ is dependent on tissue specificity

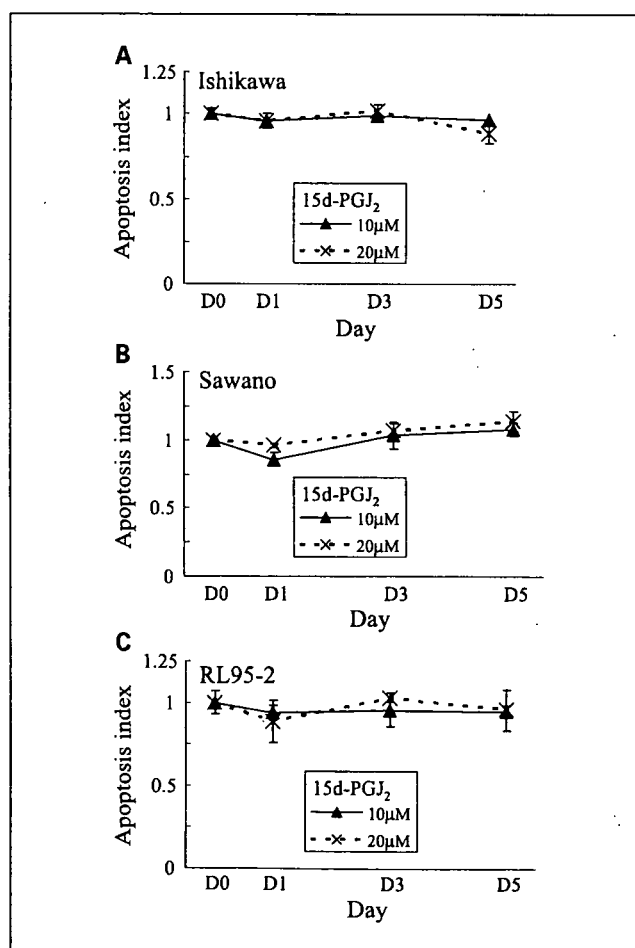


Fig. 6. Apoptosis index of (A) Ishikawa, (B) Sawano, and (C) RL95-2 cells under 15d-PGJ₂ treatments. The apoptosis index was calculated as the fold of the control absorbance. Points, mean of triplicate wells; bars, SD.

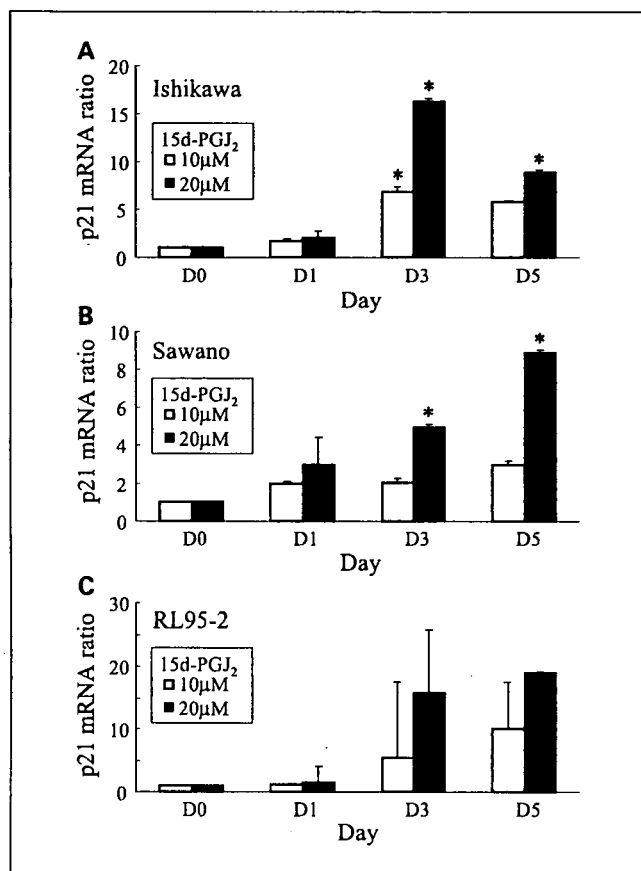


Fig. 7. Semiquantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of p21 under 15d-PGJ₂ treatments in endometrial carcinoma cell lines. (A) Ishikawa, (B) Sawano, and (C) RL95-2 cells. Values are fold of the control value. * $P < 0.05$ versus day 0. Bars, SD of duplicate samples.

and/or the mutational events that are required for cancer development.

We showed that PPAR γ LI was higher in endometrium in the secretory phase than the proliferative phase. We examined previously the expression of RXRs in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and endometrial carcinoma (31). RXR γ immunoreactivity was detected in the nuclei of epithelial cells of the secretory-phase endometrium but not of the proliferative phase. Loughney et al. also reported that intracellular concentration of all-*trans* retinoic acid, a ligand of RXRs, was elevated during the secretory phase because of a marked reduction of cellular retinoic acid protein type II mRNA (32). PPAR γ was shown to heterodimerize RXRs, which is also consistent with the results of our study. PPAR γ may also have antiproliferative effects in secretory-phase endometrium.

In *in vitro* experiments, 15d-PGJ₂ markedly inhibited cell proliferation of the endometrial carcinoma cell lines at 10 and 20 μ mol/L. 15d-PGJ₂ is both an endogenous PPAR γ ligand and a direct inhibitor of several other signal transduction pathways (33). 15d-PGJ₂ has been considered an endogenous ligand; Forman et al. reported that prostaglandin D₂ is the major prostaglandin in most tissues and PGJ₂ derivatives may be produced at several of these sites (8). Nosjean et al. also showed that prostaglandins were cyclooxygenase products, and a final

product of this pathway, PGJ₂, is nonenzymatically converted into 15d-PGJ₂ (7). Parikh et al. reported the following three findings. (a) 15d-PGJ₂ activated PPAR γ -dependent signaling systems more potently than other fatty acids that have been studied. (b) A representative synthetic cyclopentenone-prostaglandin, Δ^{12} -PGJ₂, was actively transported into the nucleus in a time- and temperature-dependent manner with Michaelis-Menten kinetics, suggestive of carrier-mediated active transport. Finally, formation of immunoreactive 15d-PGJ₂ has been detected during the propagation and resolution of inflammation in association with PPAR γ activation (34). Nakashiro et al. reported that low-dose 15d-PGJ₂ (0.5 μ mol/L) almost completely inhibited the growth of nonneoplastic human urothelial cell line and 10 μ mol/L 15d-PGJ₂ suppressed the growth of neoplastic urothelial cells (28). Several investigators also showed that 15d-PGJ₂ inhibited the growth of pancreatic carcinoma cells (35), lung carcinoma cells (36, 37), and gastric carcinoma cells (38). These antiproliferative effects of 15d-PGJ₂ discussed above are all considered to be mediated by several pathways: PPAR γ dependent and PPAR γ independent. The lipopolysaccharide-induced transcription responses of activator protein-1, nuclear factor- κ B, and STAT1 can be repressed by 15d-PGJ₂ only in the presence of PPAR γ (39). Two identified candidates have been proposed to mediate PPAR γ -independent actions of 15d-PGJ₂: the nuclear factor- κ B system and the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. We showed that 15d-PGJ₂ suppressed cell proliferation of the endometrial carcinoma cell lines. If 15d-PGJ₂ decreased cell proliferation through PPAR γ -dependent pathways, 15d-PGJ₂ may represent a new therapy for human PPAR γ -positive endometrial carcinoma.

In this study, PPAR γ immunoreactivity was significantly correlated with that of p21 in endometrial carcinoma tissues, and expression of p21 was induced by 15d-PGJ₂ at mRNA levels in Ishikawa, Sawano, and RL95-2 cells. Apoptosis indexes of cell lines were not altered under 10 and 20 μ mol/L 15d-PGJ₂ treatment for 5 days. Several studies showed that PPAR γ ligands induced cyclin-dependent kinase inhibitors, such as p21, in various types of carcinoma cells (25, 40, 41). The p21 protein inhibits cyclin-dependent kinases and mediates cell cycle arrest and cell differentiation. A potential conserved consensus peroxisome proliferator-responsive element was detected in the promoter region of p21 gene (25, 40). Suzuki et al. reported that the expression of p21 was significantly induced by 15d-PGJ₂ at both mRNA and/or protein levels in MCF-7 breast carcinoma cell line and apoptosis index of MCF-7 cells was not significantly altered under the 15d-PGJ₂ for 3 days (25). Jung et al. also showed that a large portion of human cervical carcinoma cell line C-4II cells showed growth arrest at G₁ phase with the induction of p21 following ciglitazone treatment (41). They also reported that PPAR γ ligands suppressed cervical cancer cell proliferation by inhibiting cell growth, not by triggering apoptosis at least in this cell line examined (41). Shen et al. also reported that 15d-PGJ₂ induced the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protein in human chondrosarcoma cells in a p53-independent manner, which seems to be involved in the mechanism of inhibition of cell proliferation (40). Results of our present study are consistent with all of these studies reported previously and suggest that PPAR γ also regulates the expression of p21 in endometrial carcinoma tissues.

Approximately 50% of endometrial carcinoma patients had obesity and hypertension and 24% of the patients had type II diabetes mellitus in our present study. These results are also consistent with reported results of previous studies (16, 18, 42, 43). The NIH defines a normal BMI as 18.5 to 24.9. Overweight is defined as a BMI between 25.0 and 29.9. Class I obesity is a BMI between 30 and 34.9, class II obesity between 35.0 and 39.9, and class III obesity as >40 (44). However, among Japanese women, there are fewer class I obese people than in Western countries (19). Therefore, the Japan Society for the Study of Obesity originally defined class 1 obesity as BMI between 25 and 29.9, class 2 obesity as between 30 and 34.9, class 3 obesity as between 35 and 39.9, and class 4 obesity as ≥ 40 (19). Therefore, in this study, which examined Japanese patients with endometrial carcinoma, we defined obesity as a BMI ≥ 25 . In our study of Japanese women with endometrial carcinoma, patients with endometrial carcinoma had high BMI, but paradoxically obese women with endometrial carcinoma had longer disease-free survival than non-obese women with carcinoma. Everett et al. reported that, in 396 endometrial carcinoma women, women with BMI > 40 had a lower recurrence rate compared with those with BMI < 30 (4.7% versus 13%), but the difference did not reach statistical significance ($P = 0.065$; ref. 42). Anderson et al. also reported that disease-free survival increased significantly ($P = 0.014$), and recurrence rates decreased as BMI increased (45). Therefore, an inverse correlation between biological behavior and obesity seems to be observed in both Japanese and Western patients with endometrial carcinoma. Further investigation is needed to clarify the mechanisms.

There was a significant negative correlation between PPAR γ expression and BMI in women with endometrial carcinoma ($P < 0.0001$). To the best of our knowledge, this is the first study that analyzed the correlation between PPAR γ expression and BMI in endometrial carcinoma patients. Kadowaki et al.

reported that PPAR γ was a thrifty gene mediating high-fat diet-induced obesity, adipose hypertrophy, and insulin resistance (46). They also reported that genetic or environmental factors causing obesity might interact with the PPAR γ gene, leading to differences in insulin sensitivity between subjects with and without this substitution in overweight and obese subjects. Trujillo et al. reported that circulating adiponectin, a hormone produced exclusively by the adipocyte, was a biomarker of the metabolic syndrome (47). Adiponectin functions as an insulin sensitizer by decreasing hepatic glucose output and thereby contributing to the regulation of whole-body insulin homeostasis. Combs et al. reported induction of adipose tissue adiponectin expression and subsequent increases in circulating adiponectin levels represented a novel potential mechanism for PPAR γ -mediated enhancement of whole-body insulin sensitivity (48). PPAR γ agonists are known to raise circulating adiponectin levels (48). Maso et al. proposed that the combined effects of low plasma adiponectin and high BMI contributed to a >6 -fold excess risk (49). These results may also explain an inverse correlation between BMI and PPAR γ expression in endometrial carcinoma detected in our present study, but further investigations are awaited for clarification.

In our present study, we showed the expression of PPAR γ in human endometrial carcinoma and the effects of PPAR γ ligand in endometrial carcinoma cells. These findings suggest that a PPAR γ ligand, 15d-PGJ $_2$, has antiproliferative activity against endometrial carcinoma.

Acknowledgments

We thank Dr. Masato Nishida (National Kasumigaura Hospital) for providing Ishikawa 3-H-12 cells and Yoko Sugihashi (Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Graduate School of Medicine) for skillful technical assistance.

References

- Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841–50.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779–89.
- Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA. Molecular cloning, expression, and characterization of human peroxisome proliferator-activated receptors γ 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224:431–7.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994;8:1224–34.
- Ceill FS, Shuldiner AR. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and obesity. *Curr Diab Rep* 2002;2:179–85.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585–95.
- Nosjean O, Boutin JA. Natural ligands of PPAR γ : are prostaglandin J $_2$ derivatives really playing the part? *Cell Signal* 2002;14:573–83.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J $_2$ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995;83:803–12.
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J $_2$ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813–9.
- Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 2001;61:6213–8.
- Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:1–9.
- Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *Lancet Oncol* 2004;5:419–29.
- Mueller E, Smith M, Sarraf P, et al. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10990–5.
- Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ligand troglitazone as treatment for refractory breast carcinoma: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:391–7.
- Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciort R, Debiec-Rychter M, Oyen R, Oosterom AV. A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* 2003;89:1409–12.
- Frank BHU, Chen L. Overweight and obesity in women: health risks and consequences. *J Womens Health* 2003;12:163–72.
- Chen L, Berek JS. Clinical features and diagnosis of endometrial cancer. *UpToDate* 2003;12:1–6.
- Berstein LM, Kvatchevskaya JO, Poroshina TE, et al. Insulin resistance, its consequences for the clinical course of the disease, and possibilities of correction in endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:687–93.
- Inoue M, Sobue T, Tsugane S; for the JPHC Study Group. Impact of body mass index on the risk of total cancer incidence and mortality among middle-aged Japanese: data from a large-scale population-based cohort study—the JPHC Study. *Cancer Causes Control* 2004;15:671–80.
- Matsuzawa Y, Inoue S, Ikeda Y, et al. Japan Society for the Study of Obesity. *Himankennyuu* 2000;6:18–28.
- Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. In: WHO classification of tumors. Lyon: WHO; 2003. p. 113–45.
- Creasman WT. Announcement FIGO stages: 1988 revisions. *Gynecol Oncol* 1989;35:125–7.
- Nishida M, Kasahara K, Oki A, Satoh T, Araki Y, Kubo T. Establishment of eighteen clones of Ishikawa cells. *Hum Cell* 1996;9:109–16.
- Satoh T, Nishida M, Miyazaki Y, et al. Establishment of a cisplatin-resistant new human endometrial adenocarcinoma cell line, Sawano cells. *Hum Cell* 1995;8:67–72.
- Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:233–50.
- Terashita Y, Sasaki H, Haruki N, et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor γ gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:238–43.

27. Sasaki H, Tanahashi M, Yukiue H, et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor γ gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2002;36:71–6.
28. Nakashiro K, Hayashi Y, Kita A, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor γ and its ligands in non-neoplastic and neoplastic human urothelial cells. *Am J Pathol* 2001;159:591–7.
29. Zhang GY, Ahmed N, Riley C, et al. Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2005;92:113–9.
30. Ikezoe T, Miller CW, Kawano S, et al. Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene in human malignancies. *Cancer Res* 2001;61:5307–10.
31. Ito K, Suzuki T, Moriya T, et al. Retinoid receptors in the human endometrium and its disorders: a possible modulator of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2721–7.
32. Loughney AD, Kumarendran MK, Thomas EJ, Redfern CP. Variation in the expression of cellular retinoid binding proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1995;10:1297–304.
33. Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ₂: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 2005;114:100–9.
34. Parikh LCB, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and the ligation of PPAR γ . *J Clin Invest* 2003;112:945–55.
35. Eible G, Wente MN, Reber HA, Hines OJ. Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:522–9.
36. Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, et al. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:400–5.
37. Chang TH, Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:1129–38.
38. Chen YX, Zhong XY, Qin YF, Bing W, He LZ. 15d-PGJ₂ inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:2149–53.
39. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79–82.
40. Shen ZN, Nishida K, Doi H, et al. Suppression of chondrosarcoma cells by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ is associated with altered expression of Bax/Bcl-xL and p21. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:375–82.
41. Jung T, Baek W, Suh S, et al. Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005;97:365–73.
42. Everett E, Tamimi H, Greer B, et al. The effect of body mass index on clinical/pathologic features, surgical morbidity, and outcome in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003;90:150–7.
43. Kuriyama S, Tsubono Y, Hozawa A, et al. Obesity and risk of cancer in Japan. *Int J Cancer* 2005;113:148–57.
44. Karen A. Executive summary of the clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. *Arch Intern Med* 1998;158:1855–67.
45. Anderson B, Connor JP, Andrewes JL, et al. Obesity and prognosis in endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1171–9.
46. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 2003;228:1111–7.
47. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005;257:167–75.
48. Combs TP, Wagner JA, Berger J, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPAR γ agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002;143:998–1007.
49. Maso L, Augustin LSA, Karalis A, et al. Circulating adiponectin and endometrial cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1160–3.

熱可逆性ハイドロゲル (Thermoreversible gelation polymer; TGP) を培養基材に用いた再発した婦人科癌に対する抗癌剤感受性試験

おおはら たつる きぐち かずしげ わだ やすな すずき なお
大原 樹¹ 木口 一成¹ 和田 康菜¹ 鈴木 直¹
こばやし よういち つまかわ さとし いしづか おんべい
小林 陽一¹ 月川 賢² 石塚 文平¹

(受付:平成 18 年 8 月 17 日)

抄 録

熱可逆性ハイドロゲル (Thermoreversible gelation polymer; TGP) は、転移温度(22°C)の上下でゾル・ゲル状態が可逆的に変化する高分子化合物である。TGP 内で固形癌組織は三次元的に増殖するのに対して、繊維芽細胞は増殖を認めない特徴を有する。再発した婦人科癌に対してより有効な化学療法を計画するため、この新しい培養用基材を用いて抗癌剤感受性試験を施行し臨床応用することを目的とする。再発した婦人科癌患者 45 例(子宮頸癌 7 例, 子宮体癌 5 例, 卵巣癌 33 例)を対象患者とし、十分なインフォームドコンセントのもと、再発腫瘍の生検あるいは手術摘出を行った。手術より切除された検体(癌組織)を 0.5 mm 厚に細切した。24 well プレートに冷却によってゾル状態となった TGP を注入し、37°C で 4 日間培養した。培養した組織に対し TGP を用いた感受性試験を施行し、CDDP (cisplatin), MMC (mitomycin C), 5FU (5-fluorouracil), PTX (paclitaxel), CPT-11 (irinotecan) に関する IC₅₀ (inhibition concentration; 50% 抑制濃度) 値を求めた。45 例中、IC₅₀ 値を算出できた 41 例(91.1%)において判定可能であった。個々の症例に応じて、感受性を認めた抗癌剤を用いオーダーメイドな化学療法(点滴静注, 動注療法など)を施行した。評価可能病変を有した症例の奏効率は子宮頸癌 66.7%, 子宮体癌 33.3%, 卵巣癌 42.3%, 全体 45.7% であった。また、真陽性率 45.7%, 真陰性率 100%, 感度 100%, 特異度 9.5% であり臨床効果予測率は 48.6% であった。新しい培養用基材 (TGP) を使用した感受性試験は、再発した婦人科癌患者の化学療法の個別化を目指すうえで有効な手段であると考えられる。

索引用語

抗癌剤感受性試験, 熱可逆性ハイドロゲル (Thermoreversible gelation polymer; TGP),
組織培養, 婦人科癌

緒 言

近年わが国において、婦人科癌に対する多剤併用化学療法の投与計画は多岐にわたっており、初回治

療は臓器別、組織別に選択される傾向にあり、再発・再燃時には十分なエビデンスを伴わない初回治療と異なった投与計画が試行されているに過ぎない。また、化学療法後に短期間で再発した癌に対しては、抗癌剤の感受性が低く、有効な化学療法が確立されていない¹⁾。このような再発患者は前治療による毒性のため、強力な化学療法が行えないことも

1 聖マリアンナ医科大学 産婦人科
2 同 外科学(消化器・一般外科)

多い。そこで、各種薬剤の耐性機構を解明し、婦人科癌患者それぞれに有効な薬剤を選択し併用することができれば、余計な副作用を回避でき、化学療法の奏効率は上昇し、予後を著しく改善しうると考えられる。

抗癌剤感受性試験は、同一の臓器由来で同一の組織型を有する癌においても抗癌剤に対する感受性は異なるという現象から開発されてきた。Hamburger²⁾の報告により抗癌剤感受性試験が広く臨床に紹介され、一時的な世界的普及をみたが、判定可能率の低さが臨床家の足を遠のかせ、一般的検査に至るまでにはならなかった。そこでこの欠点を補い、簡便かつ迅速に結果が得られ、しかも個々の症例に有効(オーダーメイド)な薬剤選択を可能とする感受性試験の確立が強く望まれてきた。

熱可逆性ハイドロゲル(Thermoreversible gelation polymer; TGP)は、転移温度(22°C)の上下でゾル・ゲル状態が可逆的に変化する高分子化合物である。TGPの特徴として、細胞の包埋・回収が酵素処理を必要とせず、温度変化のみで可能であり、細胞や組織に障害を与えない。形態変化を位相差顕微鏡で観察できる。培養日数を必要とする時間依存性薬剤でも感受性試験が可能である。TGP内で固形癌組織は三次元的に増殖するのに対して、線維芽細胞は増殖を認めないなどが挙げられる^{3,4)}。

以上の背景をもとに我々は、TGPを培養用基材に用いて、再発した婦人科癌、特に難治性である再発した卵巣癌を中心に感受性試験を行い、結果に基づきオーダーメイドな化学療法を行い、治療効果を解析し、その有用性について評価した。

材料および方法

1. 対象

2004年2月から2006年6月まで聖マリアンナ医科大学病院にて手術あるいは生検をした再発した婦人科癌患者45例(子宮頸癌7例、子宮癌5例、卵巣癌33例)を対象とした(Table 1)。全例、試験前に十分な説明を行い、文書で同意を得た。また、本研究の施行に際し、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会にて承認を得た(承認番号第1071号)。各症例の年齢、感受性試験前の治療の内容、進行期分類をTable 2a, 2b, 2cに示す。

2. TGPと培養液の作成

TGPは吉岡らの方法^{7,8)}で作成した。TGPの粉末

にRPMI1640(Life Technologies, NY., USA)を加え4°C下で24時間攪拌溶解し、最終濃度5.5%(wt/wt)に調整した。培養液は、RPMI1640に20% Fetal calf serum(FCS, Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Sydney, Australia), penicillin(10,000 unit/ml)/streptomycin(100 µg/ml)(Life Technologies, NY., USA), L-glutamine 2 mM(Life Technologies, NY., USA)を加えたものを用い、以下の実験に用いた。

3. 検体採取と組織片の作成

手術より切除された検体(癌組織)を5 mm角に切除し、抗生剤入りHanks'液(Hanks' balanced salt solution; HBSS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)に1時間接触後、壊死組織や血液成分を可能な限り除去し、反復洗浄した。その後組織細切器McIlwain Tissue Chopper(The Mickle Laboratory Engineering Co., Ltd. Surrey, UK)を用いて癌組織を0.5~1.0 mm厚に細切した。24 well 平底プレート(FALCON, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)に冷却によってゾル状態となったTGPを300 µl/well注入した。これに細切した組織を3~5個を包埋して、以下の実験を行った。

また、腹水及び腫瘍内容液に関しては細胞診により癌細胞の存在を確認したのち、患者より採取した腹水及び内容液約100 mlを1000 r.p.m., 6分間遠心分離後、4°Cの低温化下でゾル状態のTGPを用い細胞混濁液(5.0×10⁵個/ml)を作成した。血性腹水の場合は、Ficoll-Paque(Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)を用いた比重遠沈法により、癌細胞を分離後、同様の操作を行った。

4. 組織の培養法

上記の手順で用意したプレートに培養液650 µl/wellを添加し、37°C, 5%CO₂大気条件下で培養した。

5. 抗癌剤感受性試験

実際の操作手順をFig. 1に示す。組織片を包埋した状態で、培養液300 µl/mlを添加し、抗癌剤感受性試験用プレートとした。5種の抗癌剤、cisplatin(CDDP)(Bristol-Myers Squibb Company, NY., USA), mitomycin C(MMC)(Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, JPN), 5-fluorouracil(5FU)(Kyowa Hakko Kogyo.), paclitaxel(PTX)(Bristol-Myers Squibb Co. Ltd., NY., USA), and irinotecan(CPT-11)(Daiichi Pharmaceutical Co.

Table 1. Types of Tumor and Samples

	Sample	No.
Cervical cancer	Tissue	7
Endometrial cancer	Tissue	5
Ovarian cancer	Tissue	20
	Ascites	9
	Intratumoral fluid	4
Total		45

Table 2a. Characteristics of Patients with Cervix Cancer

No.	Age	Stage	Chemotherapy of pre chemosensitivity test	Course	Chemotherapy of post chemosensitivity test	Course
1	45	IIb	-	-	CDDP + 5FU	4
2	53	Ib	PTX + CBDCA	6	CDDP i.a.	4
3	72	Ib	CPT-11 + MMC	5	CDDP + MMC + 5FU i.a.	6
4	51	Ib	NDP	5	CPT-11	5
5	43	IIb	-	-	CDDP + MMC i.a.	4
6	48	IIIb	CDDP + BLM + 5FU i.a.	2	PTX + CBDCA	6
7	57	Ib	CDDP + CPT-11	3	CDDP + MMC i.a.	3

CDDP; cisplatin, MMC; mitomycin C, 5FU; 5-fluorouracil, PTX; paclitaxel, CPT-11; irinotecan, NDP; nedaplatin, BLM; bleomycin, CBDCA; Carboplatin
 PTX + CBDCA; PTX; 180 mg/m², CBDCA AUC6/every 4w i.v., NDP; 25mg/m²/w i.v., CPT-11 + MMC; CPT-11 60mg/m², MMC 7mg/m²/every 2-3w i.v., CDDP + CPT-11; CDDP 60mg/m²/day1, CPT-11; 60mg/m²/day1,8,15 i.v., CPT-11; 60mg/m²/w i.v., CDDP + BLM + 5FU i.a.; CDDP 70mg/m², BLM 10mg/body, 5FU 700mg/m²/every 2-3w i.a., CDDP i.a.; CDDP 100 mg/body/every 2-3w i.a., CDDP + MMC + 5FU i.a.; CDDP 70 mg/m², MMC 7mg/m², 5FU 700mg/m²/every 2-3w i.a., CDDP + 5FU; CDDP 20mg/body/day1-5, 5FU 500 mg/body/day1-5/every 4w i.v., CDDP + 5FU i.a.; CDDP 70mg/m², 5FU 700mg/m²/every 4w i.a., CDDP + MMC i.a.; CDDP 70mg/m², MMC 7mg/m²/every 4w i.a., i.v.; intra-venous chemotherapy, i.a.; intra-arterial chemotherapy

Table 2b. Characteristics of Patient with Endometrial Cancer

No.	Age	Stage	Chemotherapy of pre chemosensitivity test	Course	Chemotherapy of post chemosensitivity test	Course
1	62	IV	TXT + CBDCA	6	CPT-11	9
2	37	IIIa	CDDP i.a.	3	CDDP + 5FU	4
3	74	IV	PTX + CBDCA	4	CDDP + 5FU	5
4	64	IIIc	PTX + CBDCA	6	-	
5	73	IIIa	PTX + CBDCA	6	-	

CDDP; cisplatin, 5FU; 5-fluorouracil, PTX; paclitaxel, CPT-11; irinotecan, CBDCA; Carboplatin, TXT; docetaxel
 PTX + CBDCA; PTX; 180 mg/m², CBDCA AUC6/every 4w i.v., TXT + CBDCA; TXT 70 mg/m², CBDCA AUC 6/every 4w i.v., CDDP i.a.; 100mg/body/every 2-3w i.a., CPT-11; 60mg/m²/w i.v., CDDP + 5FU; CDDP 20mg/body/day1-5, 5FU 500 mg/body/day1-5/every 4w i.v., i.v.; intra-venous chemotherapy, i.a.; intra-arterial chemotherapy

Table 2c. Characteristics of Patients with Ovarian Cancer

No.	Age	Stage	Chemotherapy of pre chemosensitivity test	Course	Chemotherapy of post chemosensitivity test	Course
1	62	IIIc	TXT + CBDCA	6	CDDP + 5FU i.a.	3
2	55	IIIb	PTX + CBDCA	6	MMC i.a.	4
3	75	IIIc	PTX + CBDCA	6	w PTX + CBDCA	12
4	62	IV	PTX + CBDCA	6	CDDP + 5FU i.a.	4
5	66	IIIc	PTX + CBDCA	6	MMC i.a.	
			CDDP + CPT-11	3		
6	68	IIIc	PTX + CDDP	6	w PTX + CBDCA	12
7	54	IIIc	PTX + CBDCA	6	CDDP + MMC i.a.	3
			CDDP + CPT-11	3		
8	74	IIc	PTX + CBDCA	6	-	
9	41	IIIc	PTX + CBDCA	6	CDDP i.a.	3
10	54	IIc	CDDP + CPT-11	3	CDDP i.a.	3
11	59	IIc	PTX + CBDCA	2	-	
12	71	IIIc	PTX + CBDCA	6	MMC + 5FU i.a.	3
13	53	IIIb	PTX + CBDCA	8	PTX	12
14	59	IIc	CDDP + CPT-11	6	-	
15	52	IV	CPT-11 + CDDP	6	-	
16	55	IIIc	PTX + CBDCA	6	CPT-11	3
17	62	IV	PTX + CDDP	6	CDDP + MMC i.a.	3
18	84	IIIc	PTX + CBDCA	3	MMC	4
19	55	IV	PTX + CBDCA	6	-	
			CDDP	2		
20	66	IV	CDDP + CPT-11	6	-	
21	21	Ic	CDDP + CPT-11	6	CDDP + 5FU	6
22	54	IIIc	PTX + CBDCA	6	CDDP + 5FU	3
23	67	IIIc	PTX + CBDCA	6	w PTX + CBDCA	12
24	64	IV	PTX + CBDCA	3	CDDP + MMC i.a.	3
25	47	Ic	CDDP	3	CDDP + 5FU	5
26	45	IV	CDDP	3	5FU i.a.	6
27	46	IIIc	PTX + CBDCA	6	CDDP + 5FU	6
28	55	Ic	PTX + CBDCA	3	CDDP + MMC	3
29	53	Ic	PTX + CBDCA	6	w PTX + CBDCA	12
30	64	IIIc	PTX + CBDCA	6	w PTX + CBDCA	16
31	67	Ic	PTX + CBDCA	3	MMC i.a.	3
32	71	IIIc	PTX + CBDCA	6	w PTX + CBDCA	12
33	68	IIIc	PTX + CDDP	6	-	

CDDP; cisplatin, MMC; mitomycin C, 5FU; 5-fluorouracil, PTX; paclitaxel, CPT-11; irinotecan, NDP; nedaplatin, BLM; bleomycin, CBDCA; Carboplatin, TXT; docetaxel
 PTX + CBDCA; PTX; 180 mg/m², CBDCA AUC6/every 4w i.v., TXT + CBDCA; TXT 70 mg/m², CBDCA AUC 6/every 4w i.v., PTX + CDDP; PTX 180mg/m², CDDP 100mg/body/every 4w i.v., NDP; 25mg/m²/w i.v., CDDP; 100mg/body/every 2-3w i.p. or i.a., CDDP + CPT-11; CDDP 60mg/m²/day1, CPT-11; 60mg/m²/day1,8,15 i.v., CDDP + BLM + 5FU i.a.; CDDP 70mg/m², BLM 10mg/body, 5FU 700mg/m²/every 2-3w i.a., CDDP + MMC + 5FU i.a.; CDDP 70 mg/m², MMC 7mg/m², 5FU 700mg/m²/every 2-3w i.a., CDDP + 5FU; CDDP 20mg/body/day1-5, 5FU 500 mg/body/day1-5/every 4w i.v., CDDP + 5FU i.a.; CDDP 70mg/m², 5FU 700mg/m²/every 4w i.a., w PTX + CBDCA; PTX 80mg/m², CBDCA AUC2/w i.v., CDDP + MMC; CDDP 60mg/m²/day1, MMC 7mg/m²/day1,8,15 i.v., CDDP + MMC i.a.; CDDP 70mg/m², MMC 7mg/m²/every 4w i.a., 5FU i.a.; 5FU 700 mg/m²/every 2w i.a, MMC i.a.; MMC 7mg/m²/every 2w i.a., MMC; MMC 7mg/m²/every 2w i.v., i.v.; intra-venous chemotherapy, i.a.; intra-arterial chemotherapy

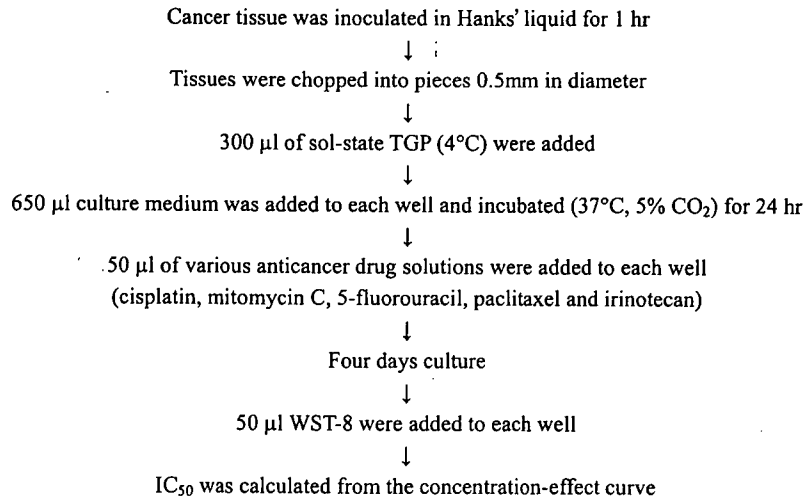


Figure 1. Procedure of chemosensitivity test.

Ltd., Tokyo, JPN) をそれぞれ添加し、4日間接触させた。各抗癌剤は最終濃度が CDDP; 25, 2.5, 0.25, 0.025 $\mu\text{g/ml}$, MMC; 10, 1.0, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 5FU; 500, 50, 5.0, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, PTX; 100, 10, 1, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, CPT-11; 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ となるように調整して用いた。

組織の viability の測定は、水溶性の Formazann を形成する WST-8: (2-(2-methoxyl-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) (Dojindo Laboratories Co. Ltd., Kumamoto, JPN)^(9,11) を各 well に 50 μl 添加し、37°C で 24 時間反応させた。その後 4°C に 1 時間保冷し、均一な水溶液の状態にした。マイクロプレート用比色計 (Labsystems Multiscan MS; Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, JPN) を用いて 450 nm (参照波長 620 nm) で吸光度を測定した。一方、組織片の蛋白濃度測定は BCA (Bicinchonic acid) 法による BCA Protein Assay Kit (PIERCE : Rockfold, IL, USA) を使用して測定した。すなわち BCA 試薬を各組織に 600 μl 添加して 37°C にて 30 分反応させた後、波長 570 nm で吸光度を測定した。

組織の viability は組織蛋白量当たりの WST-8 の吸光度で表した。組織の生存率を、組織生存率(%) = (抗癌剤処理した単位組織蛋白当たりの OD (optical density) / コントロールの単位組織蛋白当たりの OD) $\times 100$ で求め、各濃度における生存率をプロットし濃度依存曲線を求めた。得られたグラフから各薬剤の IC₅₀ 値 (inhibition concentration; 50%

抑制濃度) を算出した。各薬剤について得られた IC₅₀ 値と各抗癌剤の最高血中濃度 (Peak Plasma Concentration; PPC)^(12,13) を比較し、IC₅₀ 値 < PPC (CDDP; 4.98 $\mu\text{g/ml}$, MMC; 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 5FU; 120.0 $\mu\text{g/ml}$, PTX; 20.0 $\mu\text{g/ml}$, CPT-11; 0.05 $\mu\text{g/ml}$) の場合、感受性ありと判定した。

6. 感受性試験後の治療

患者の全身状態、再発部位を考えながら感受性が認められた抗癌剤を中心に投与計画を決め、オーダーメイドな化学療法 (点滴静脈投与、動注療法) を施行した。(Table 2a, 2b, 2c) また、感受性の認めなかった症例に対しては CDDP および CPT-11 を中心とした投与計画を決め、治療を行った。患者によっては感受性試験後に状態が急変し、治療不可能な例も認めた。

7. 効果判定および統計解析

抗癌剤投与後の効果判定は婦人科癌化学療法の直接効果判定基準に沿って評価した。すべての標的病変が腫瘍による二次的変化を含めて消失した場合を著効; Complete response (CR), ベースライン長径和と比較して標的病変の長径和が 30% 以上減少した場合を有効; Partial response (PR), 標的病変の長径和が、それまでの最も小さい長径和に比して、20% 以上大きくなった場合を進行; Progressive disease (PD), PR に該当する腫瘍縮小や PD に該当する腫瘍増大を認めない場合を安定; Stable disease (SD) とした。各群間の比較は χ^2 検定によって行った。

Table 3a. IC₅₀ of Each Anticancer Drug in Cervical Cancer Cases

No.	IC ₅₀ (μg/ml)				
	CDDP	MMC	5FU	PTX	CPT-11
1	1.05	1.47	29.3	44.4	1000<
2	3.59	1000<	77.6	127	0.35
3	4.26	0.382	20.9	15.2	3.81
4	7.34	5.90	1000<	1000<	1000<
5	1.20	0.93	239	335.6	1000<
6	0.30	0.50	42.0	0.20	1000<
7	9.90	5.57	967	107	788

Table 3b. IC₅₀ of Each Anticancer Drug in Endometrial Cancer Cases

No.	IC ₅₀ (μg/ml)				
	CDDP	MMC	5FU	PTX	CPT-11
1	9.39	5.50	1000<	287	1000<
2	2.50	1000<	68.8	1000<	1000<
3	3.50	0.40	90.7	40.1	1000<
4	31.7	1.10	1000<	19.1	0.20
5	19.9	22.8	1000<	137	1000<

Table 3c. IC₅₀ of Each Anticancer Drug in Ovarian Cancer Cases

No.	IC ₅₀ (μg/ml)				
	CDDP	MMC	5FU	PTX	CPT-11
1	2.48	0.78	1.74	13.9	0.03
2	6.37	1.97	330	224	0.11
3	2.49	3.04	69.8	0.16	39.5
4	0.20	1000<	5.6	1000<	1000<
5	1000<	1.50	398	75.6	2.90
6	2.00	1.30	64.4	10.8	1000<
7	1.00	5.60	1000<	29.4	1000<
8	1000<	1000<	1000<	1000<	1000<
9	0.10	0.30	3.70	3.50	0.10
10	6.00	4.60	157	317	1000<
11	1.30	0.70	0.40	1000<	1000<
12	7.00	0.20	14.6	25.7	1000<
13	0.40	1000<	21.4	0.80	1000<
14*	-	-	-	-	-
15*	-	-	-	-	-
16*	-	-	-	-	-
17	2.30	3.00	548	33.4	1000<
18	0.40	2.60	169	41.6	1000<
19	1.70	7.60	1000<	101	955
20	0.50	1.80	2.60	6.80	0.50
21	0.40	0.90	13.6	15.4	0.20
22	1.10	18.1	36.8	3.50	0.60
23	1.80	0.40	33.6	7.6	1000<
24	1.50	4.10	312	25.0	4.50
25	0.40	0.20	83.8	35.8	1000<
26	7.90	4.00	59.0	62.6	1000<
27	3.67	7.35	1.91	24.1	1000<
28	0.484	0.07	159	11.4	3.70
29	1.50	49.3	18.0	1.33	0.09
30	5.10	1.35	1000<	8.93	1000<
31	7.4	0.435	220	20.7	1000<
32	1000<	45.3	0.14	11.5	0.03
33*	-	-	-	-	-

CDDP; cisplatin, MMC; mitomycin C, 5FU; 5-fluorouracil, PTX; paclitaxel, CPT-11; irinotecan

* no evaluable cases.

Table 4. Evaluability Rate of the Assay

		Cervical cancer	Endometrial cancer	Ovarian cancer	Total
Total		7	5	33	45
Evaluable cases	Tissue	7	5	20	32
	Ascites			6	6
	Intratumoral fluid			3	3
Evaluability rate ^{a)}		100	100	87.8	91.1

^{a)} Evaluable cases / Total (%)

Table 5. *In vitro* Sensitivity Determined by the TGP Method

	Cervical cancer	Endometrial cancer	Ovarian cancer	Total
CDDP	71.4 ^{a)}	40.0	69.0	65.9
MMC	57.1	40.0	55.2	53.7
5FU	57.1	40.0	56.8	56.1
PTX	28.6	20.0	44.8	39.0
CPT-11	0	0	6.90	4.90

^{a)} Date are shown of as number of sensitive cases / number of evaluable cases (%).

CDDP; cisplatin, MMC; mitomycin C, 5FU; 5-fluorouracil, PTX; paclitaxel, CPT-11; irinotecan

Table 6. Clinical Effects of Chemotherapy for Each Tumor Type

	Cervical cancer	Endometrial cancer	Ovarian cancer	Total
CR	2	1	3	6
PR	2	0	8	10
SD	2	1	10	13
PD	0	1	4	6
Total	6	3	25	35
Response rate ^{a)}	66.7	33.3	42.3	45.7

^{a)} (CR + PR) / Total (%)

CR; complete response, PR; partial response, SD; stable disease, PD; progressive disease

結 果

1. 判定可能率 (Table 4)

TGP 法で判定可能であった症例数は 45 例中 41 例で、Table 3a, 3b, 3c に各抗癌剤の IC₅₀ 値を示す。判定可能率は 91.1% であった。腫瘍組織では全例において判定可能であった。卵巣癌症例の腹水 3 例、腫瘍内容液 1 例の合計 4 例が判定できなかった。また、全例にコンタミネーションは認めなかった。

2. TGP 法による疾患別の薬剤感受性率 (Table 5)

5 種類の抗癌剤の中で CDDP が最も薬剤感受性

が高く、次いで 5FU, MMC の順であった。また、CPT-11 は最も感受性が低い結果となった。

3. 疾患別臨床効果 (Table 6)

TGP 法で判定可能であった 41 例について、実際に感受性試験で得られた抗癌剤を使用し化学療法を施行した。その症例のうち癌病変部において抗癌剤の効果を評価できる症例は 35 例であった。子宮頸癌では CR 2 例・PR 2 例、子宮体癌では CR 1 例、卵巣癌では CR 3 例・PR 8 例の効果が得られ、疾患別の奏効率は子宮頸癌 66.7%、子宮体癌 33.3%、卵巣癌 42.3%、全体の奏効率は 45.7% であった。

4. 臨床効果予測率 (Table 7)

Table 7. Correlation of Results of Assay and Clinical Effects of Chemotherapy

Clinical drug response	In vitro drug response	
	Positive	Negative
Positive	16	0*
Negative	19	2*

True-positive rate (TP/TP + FP): 45.7 % (16/35), True-negative rate (TN/TN + FN): 100% (2/2), Sensitivity (TP/TP + FN): 100% (16/16), Specificity (TN/FP + TN): 9.5 % (2/21), Correlation rate (TP + TN/TP + FP + TN + FN): 48.6 % (18/37). TP (true-positive) indicates that drugs which showed positive antitumor effects *in vitro* demonstrated a positive response in patients. FP (false-positive) indicates that drugs which showed positive antitumor effects *in vitro* demonstrated a negative response in patients. TN (true-negative) indicates that drugs which showed negative antitumor effects *in vitro* demonstrated a negative response in patient. FN (false-negative) indicates that drugs which showed negative antitumor effects *in vitro* demonstrated a positive response in patients.

*p < 0.05 (χ^2 -test), TP vs. TN and FP vs. FN. There was no significant difference between TP and FP.

臨床において抗癌剤の感受性を評価できた35例中16例でPR以上の効果が得られ、感受性が陽性であった薬剤の有効率に相当する真陽性率は45.7%(16/35)であった。これに対して有効薬剤が選択されなかった2症例においてPR以上の効果は得られず、真陰性率は100%(2/2)であり、感受性のない症例に対する薬剤の奏効率は0%であった。アッセイの精度を示す感度は100%(16/16)、特異度は9.5%(2/21)であり、全体の予測率は48.6%(18/37)であった。

5. 卵巣癌の治療効果に対する点滴静注と動注療法の比較 (Table 8)

今回の研究において最大の症例数が得られた卵巣癌について、抗癌剤の投与経路の違いによる治療効果について比較検討した。感受性試験を行った卵巣癌患者33例のうち、化学療法を施行した患者は26例であった。内訳は点滴静注14例(評価可能症例は13例)中CR2例・PR5例・SD5例・PD1例、奏効率は53.8%(7/13)であった。動注療法12例(評価可能所例は12例)ではCR1例・PR3例・SD5例・PD3例、奏効率は33.3%(4/12)であった。腹膜播種などにより腹水貯留を認め再発した卵巣癌9例中TGP法で判定可能であった症例は6例あり、3例が点滴静注、3例が動注療法を施行した。腹水減少を認めたのは、6例中4例(点滴静注施行3例中2例、動注療法では3例中2例)であった。

6. 再発した卵巣癌におけるCDDP, PTXの感受性 (Table 9)

初回治療においてプラチナ系化合物とタキサン系

化合物の併用化学療法を施行している再発卵巣癌例は25例であった(再発期間1ヶ月~7年, 平均1年2ヶ月)。その中でCDDPに感受性を認めたのは18例(72.0%), PTXに感受性を認めたのは12例(48.0%), CDDPおよびPTX両方に感受性を認めたのは9例(36.0%)であった。両者に耐性であったのは5例(20%)であった。

考 察

1986年にHoffmanら¹⁴⁾がコラーゲンゲルを用いた三次元培養法を確立し、1992年Furukawaら¹⁶⁾はこの培養法にMTTアッセイを組み合わせた抗癌剤感受性試験(histoculture drug response assay; HDRA)を確立し、Kubotaら¹⁷⁾によってその臨床的有用性が数多く報告されている。Tanigawaら¹⁹⁾は、三次元培養による感受性の判定が*in vivo*における感受性と一致することを報告し、三次元培養による抗癌剤感受性試験の重要性を提唱している。三次元培養による抗癌剤感受性試験は現在、HDRA法, collagen gel deposit embedded culture drug sensitivity test (CD-DST)法およびTGP法が知られている。

HDRA法は、腫瘍組織から腫瘍細胞を単離することなく約1mm角に細切した組織片をコラーゲンゲル上で培養し、MTTアッセイによりviabilityを測定する方法である。HDRA法では、細切した組織片が必ずしも均一ではないことが欠点として挙げられる。CD-DST法²⁰⁾は、必要とする細胞数は少なく、初代培養成功率が高く、細胞本来の増殖形態

Table 8. The Clinical Effects of Chemotherapy in Recurrent Ovarian Cancer Patients

	Intra-venous chemotherapy	Intra-arterial chemotherapy
CR	2	1
PR	5	3
SD	5	5
PD	1	3
Total	13	12
Response rate ^{a)}	53.8	33.3

^{a)} (CR+PR) / Total (%)

CR; complete response, PR; partial response, SD; stable disease, PD; progressive disease

Table 9. Sensitivity of CDDP and PTX for 25 Cases of Recurrent Ovarian Cancer Patients

Anticancer drug	In vitro drug response	
	Positive	Negative
CDDP	18	7*
PTX	12	13
CDDP and PTX	9	5

*p < 0.05 (χ^2 -test), in CDDP treatment, positive vs. negative.

を維持できるが、腫瘍組織に酵素的処理を行い、単離細胞浮遊液を作成しなければならず、解析に画像処理装置が必要で特定の施設でないと感受性試験を行うことができないという欠点がある。従って、抗癌剤感受性試験の必要条件である定可能率が高いこと、手技・手法が簡便であること、臨床効果を的確に予測できることなどの条件を満たすものは未だ確立されていない。

本研究で培養用基材に用いた TGP は、常温でゾル・ゲル転移し、この転移温度を境にゾル・ゲル状態が可逆的に変化することが最大の特徴である。Mosmann らの基礎的研究²²⁾により、①形態的变化を位相差顕微鏡で観察できる、②癌細胞は三次元的に増殖して spheroid を形成する、③ゲル内で線維芽細胞の増殖は認めない、④細胞の包埋・回収が酵素処理を必要とせず、温度変化のみで可能であるなどの利点が明確となり、これまで頻用されていた HDRA 法にない特徴をもつ。TGP 内では細胞間接触を保ったまま三次元的な腫瘍増殖が可能であり、酵素的処理による細胞表面、組織表面の障害をさけ生理的な条件に近い状態での感受性試験を極めて簡便に行うことが可能である。

婦人科癌、特に難治性である卵巣癌に対する標準的治療は、手術療法とそれに続くパクリタキセルとカルボプラチンによる併用化学療法である²³⁾。現

在、標準的な治療を行った卵巣癌の 70~80% は奏効するが、それらの半数の患者は 2~3 年以内に再発し、セカンドラインの化学療法を受けることになる。無治療期間が 6 ヶ月以上の再発症例については初回化学療法と同様のプラチナ製剤を含む治療が推奨されている²⁴⁾。一方、再発までの期間が 6 ヶ月未満の症例はプラチナ抵抗性とされ、標準的な治療は確立されていない²⁵⁾。また、再発卵巣癌の化学療法は、セカンドラインの化学療法に対する感受性の問題以外にも蓄積された毒性、栄養状態、全身状態の低下などがあるため、このような状況を十分考慮したうえで、治療の選択肢の一つとしてセカンドライン化学療法を計画する必要がある。そこで、TGP を培養用基材に用いた抗癌剤感受性試験の結果に基づいたオーダーメイドな化学療法を施行することにより、余計な副作用を回避でき、化学療法の奏効率は上昇し、予後を著しく改善しうると考えた。

今回再発した婦人科癌に対しておこなった TGP 法は、91.1% という高い判定可能率であった。組織での判定可能率は 100% であり、腹水は 9 例中 6 例 (66.7%) 判定可能で、腫瘍内容液は 4 例中 3 例 (75.0%) で判定可能であった (Table 4)。4 例の測定できなかった原因としてコントロールの細胞の viability が低かったため、濃度依存曲線を求めることができなかったことが挙げられる。今回組織だけ

でなく、腹水及び腫瘍内容液においても感受性試験を施行することができ感受性試験の幅を拡大することが可能となった。

卵巣癌の薬剤感受性率をみると、CDDP は最も感受性率が高く現在の卵巣癌の化学療法において欠かすことのできない抗癌剤であることが改めて再認識できた。また、5FU, MMC, PTX, CPT-11 の順で感受性を認めたことより、第2 選択あるいは第3 選択として化学療法を施行する際、抗癌剤を選択する有効な情報になりえるものと思われた (Table 5)。

TGP 法による臨床効果予測率は今回 48.6% と必ずしも満足な結果は得られなかった (Table 7)。臨床効果予測は偽陽性が多かったため、低い結果になった。再発した婦人科癌、特に難治性である卵巣癌は、全身状態の悪い患者も多く、quality of life を損なわない程度の化学療法を施行している。卵巣癌治療のセカンドラインの化学療法の奏効率が 30~40%²⁵⁾とされているなかで今回の卵巣癌治療の奏効率が 42.3% は評価できる数字であると思われる (Table 6)。感受性試験の結果が実際の化学療法の効果に反映されない理由として、特に卵巣癌は播種という特異な転移経路で再発することが多く、薬剤分布が必ずしも良好とは言えない点が挙げられる²⁶⁾。また、腹膜播種に伴い腹水の増大なども認められる。当産婦人科の独自の治療法として放射線科の協力のもと、腹膜播種による腹水貯留の患者に対し、腹腔動脈にカテーテルを留置し、抗癌剤をポラス投与することにより、播種病巣の縮小および腹水の減少を認めている。腹膜播種や血流の乏しいところに再発腫瘍を認めたため、薬剤分布の乏しい点滴静注よりも動注療法がより有効と判断し化学療法を施行したが、点滴静注による化学療法が奏効率において上回っていた (Table 8)。動注療法を行った患者の組織ではより抗癌剤に抵抗性がある可能性が考えられた。しかし、動注療法施行例において tumor dormancy, つまり腫瘍の縮小効果はないが腫瘍を増大させない例も認められたことから、無効とは言いきれない。今後の課題として感受性の判断基準に IC₅₀ 値の Cut off 値を設定し、より厳密な判定をしていきたい。また、抗癌剤の耐性機構として、癌細胞の薬物輸送タンパクの過剰発現、細胞内解毒機構の亢進、癌細胞のアポトーシス誘導機構の不活化などがあげられる²⁷⁻³²⁾。各種抗癌剤の耐性因子を探索し、抗癌剤感受性試験と抗癌剤耐性因子の発現

との相関関係について検討を行う必要があると思われる。

プラチナ系化合物およびタキサン系化合物併用の化学療法後に再発した卵巣癌症例では、TGP 法にて CDDP および PTX の両方に耐性を認めた症例は 5 例認めた (Table 9)。感受性試験後の治療は 5 例とも MMC に感受性を認めたため、MMC を中心とした動注療法を施行し、CR1 例・PR1 例・SD 3 例、奏効率が 40.0% であった。このことより、現在の卵巣癌治療の第一選択となっているパクリタキセルとカルボプラチンの併用化学療法無効症例において MMC が key drug になる可能性が示唆された。

今後の対応として感受性の高い症例には当該抗癌剤を積極的に投与すべきであるが、感受性の低い症例に対して何を投与すべきか、現在の抗癌剤感受性試験の精度から結論づけられていない。今後、抗癌剤感受性試験精度が臨床にどのように反映されるか大規模な prospective study を行う必要がある。

TGP を培養用基材に用いた抗癌剤感受性試験の結果に基づいたオーダーメイドな化学療法を施行することにより、再発した婦人科癌に対し、経験だけに基づいた不要な抗癌剤投与を排除し、患者の副作用軽減による quality of life の向上を図りたい。また、現在の化学療法は抗癌剤を併用させる場合が多く、抗癌剤併用時の感受性試験法を確立することにより、厳密な抗癌剤の選択が可能となり、奏効率の向上につながると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に多大なる御協力をいただいた聖マリアンナ医科大学産婦人科研究員の高橋則行技師、岡村麻未技師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 杉山 徹. 卵巣癌におけるセカンドライン化学療法の選択とその意義. 癌と化療 2005; 32: 28-32.
- 2) Hamburger AW and Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 1997; 197: 461-463.
- 3) 吉川剛司, 月川賢. 株化癌細胞に対する熱可逆性ハイドロゲル (TGP) を用いた 3 次元培養法

- による抗癌剤感受性試験(単層培養法との比較). 聖マリアンナ医大誌 2000; 28: 477-486.
- 4) 松岡博光. 熱可逆性ハイドロゲル (TGP) を培養用基材に用いた三次元培養による抗癌剤感受性試験. 聖マリアンナ医大誌 1999; 27: 411-418.
 - 5) 陣内祐二. 熱可逆性ハイドロゲル (TGP) を培養用基材に用いた腹水癌細胞の3次元培養と抗癌剤感受性試験. 聖マリアンナ医大誌 2001; 29: 357-366.
 - 6) Tsukikawa S, Matsuoka H, Kurahashi Y, Konno Y, Satoh K, Satoh R, Isogai A, Kimura K, Watanabe Y, Nakano S, Hayashi J and Kubota S. A new method to prepare multicellular spheroids in cancer cell lines using a thermo-reversible gelatin polymer. *Artificial Organs* 2003; 27: 598-604.
 - 7) Yoshioka H, Miami M, Mori Y and Tsuchida E. Preparation of (N-isopropylacrylamide)-b-poly(ethylene glycol) and calorimetric analysis of its aqueous solution. *J Macromol Sci* 1994; A31: 109-112.
 - 8) Yoshioka H, Mikami M, Mori Y and Tsuchida E. A synthetic hydrogel with thermoreversible gelation. I. Preparation and rheological properties. *J Macromol Sci* 1994; A31: 113-120.
 - 9) Yoshioka H, Mori Y, Tsukikawa S and Kubota S. Thermoreversible gelation on cooling and on heating of an aqueous gelation-poly (N-isopropylacrylamide) conjugate. *Polym Adv Technol* 1998; 9: 155-158.
 - 10) Takamatsu N. The new colorimetric assay (WST-1) for cellular growth with normal aging and Alzheimer's disease. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1998; 35: 535-542.
 - 11) Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y and Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1518-1520.
 - 12) Wermer S, Gary MC and Sydney ES. Model for estimation of clinically achievable plasma concentration for investigational anticancer drugs in man. *Cancer Treat Reports* 1996; 70: 1379-1382.
 - 13) Tamura T, Sasaki Y, Nishiwaki Y and Saijo N. Phase I study of paclitaxel by three hour infusion: Hypotension just after infusion is one of the major dose-limiting toxicities. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 1203-1209.
 - 14) Freeman AE and Hoffman RM. In vivo-like growth of human tumors in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2694-2698.
 - 15) Vescio RA, Redfern CH and Nelson TJ. In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5029-5033.
 - 16) Furukawa T, Kubota T and Watanabe M. High in vitro-in vivo correlation of drug response using spongegel-supported three-dimensional histoculture and MTT end point. *Int J Cancer* 1992; 51: 489-498.
 - 17) 久保田哲郎, 古川俊治, 北島正樹. 組織培養法を用いた抗癌剤感受性試験. *癌と化療* 1993; 20: 461-466.
 - 18) 久保田哲郎, 笹野信昭, Hoffmann RM. 抗癌剤感受性試験—研究から臨床へ—. *Biotherapy* 1996; 10: 847-853.
 - 19) Tanigawa N, Kitaoka A and Yamakawa M. Potential and limitation of scintillation assay (TIA) for clinical chemotherapy. *Hum Cell* 1995; 8: 173-178.
 - 20) Koezuka M, Kondo N and Kobayashi H. Drug sensitivity test for primary culture of human cancer cells using collagen gel droplet embedded culture and image analysis. *Int J Oncol* 1993; 2: 953-959.
 - 21) Kobayashi H, Tanisaka K, Kondo N, Mito Y, Koezuka M, Yokouchi H, Higashiyama M, Kodama K, Doi O and Yamada M. Development of new in vitro chemosensitivity test using collagen gel droplet embedded culture and its clinical usefulness. *Jpn J Cancer Chemotherapy* 1995; 22: 1933-1939.
 - 22) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to pro-

- liferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1973; 65: 56-63.
- 23) 日本産婦人科腫瘍学会編, 卵巣がん治療ガイドライン, 2004年版, 金原出版株式会社, 東京, 2004: 11-46.
- 24) Parmar MK, Lederman JA, Colombo N, du Bois A, Delalove JF, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, Floriani I, Javson G, Lamont A, Trope C: ICON and AGO Collaborators. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON 4 / AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 2003; 361: 2099-2106.
- 25) 蝦名康彦, 櫻木範明. 再発卵巣癌の診断と化学療法. *産婦治療* 2005; 90: 989-995.
- 26) Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS and Egorin MJ. Limited penetration of anti-cancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 878-884.
- 27) Andrews PA, Velury S, Mann SC and Howell SB. Cis-diamminedichloroplatinum (II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell. *Cancer Res* 1988; 48: 68-73.
- 28) Andrews PA and Howell SB. Cellular pharmacology of cisplatin: Perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells* 1990; 2: 35-43.
- 29) Masuda H, Ozols RF and Lai GM. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 5713-5716.
- 30) Kigawa J, Minagawa Y and Cheng X. Gamma-glutamyl cysteine synthetase up-regulates glutathione and multidrug resistance-associated protein in patients with chemoresistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 56: 2178-2184.
- 31) Herod JJ, Eliopoulos AG and Warwick J. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 2178-2184.
- 32) Kanton MB, Canman CE and Leonard CJ. P 53, cell cycle control and apoptosis: implication for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 3-15.

子宮体癌の細胞診・組織診

木口 一成*¹ 小野 晃子*² 星川 咲子*²

はじめに

わが国では近年体癌が急激に増加しつつあり、日本産婦人科学会婦人科学会によると、子宮癌に占める体癌の割合はこの20年ほどの間に15%から45%近くまで上昇している¹⁾。体癌の特徴の1つは年齢分布にあり50歳代に大きなピークがあり、60歳代がこれにつき、39歳以下の若年症例は10%以下と非常に低い。また、主訴の90%以上が不正性器出血であり、ハイリスク因子も肥満や少ない妊娠回数であることも明らかにされつつある。したがって、検診の効率化をはかるためには、スクリーニングの対象をこれらのグループにある程度限定する必要がある。スクリーニング方法としては、内膜細胞診が普及しているが、頸部の細胞診と異なり構造異型に着目した判定の習熟が必要である。さらに判定が偽陽性または陽性の場合における、正確で患者への侵襲の小さい内膜組織診の技術も要求される。

そこで本稿では、内膜細胞診の採取法や判定のコツ、さらには2次検診としての内膜組織診のコツなどについて概説を試みる。

子宮内膜細胞診による子宮内膜増殖症・子宮内膜癌のスクリーニング

1. 細胞採取法

不正出血や膿性帯下が持続するなど、臨床的に子宮内膜癌が疑われる場合には、たとえ初回の細胞診が陰性であっても繰り返し細胞診を行うとともに、組織診も施行し適宜経腔エコーや子宮鏡を併用しつつ、偽陰性を避ける努力をすべきである。現在、本邦で行われている採取法は吸引法と擦過法とに大別されるが、いずれの方法によっても体癌の検出率は85～95%と高い。しかしながら採取法や採取器具により、挿入率や採取細胞量に差異がみられ、一長一短がある(表1)²⁾。したがって、細胞採取時には各々の方法の長所を生かしつつ、症例に応じて選択するのが妥当だと思われる(最近擦過法が多い)。

2. 子宮内膜細胞診

近年、細胞異型に代表される細胞の個々の変化のみでなく、細胞の立体構築の変化、すなわち構造異型にも注目することが内膜細胞診の精度向上に役立つといわれてきている。

われわれも和泉ら³⁾の基準にしたがい、細胞集団の構造に注目し、下記のように診断を行っている(図1)。

1) 単純型子宮内膜増殖症(旧嚢胞性腺増殖症)

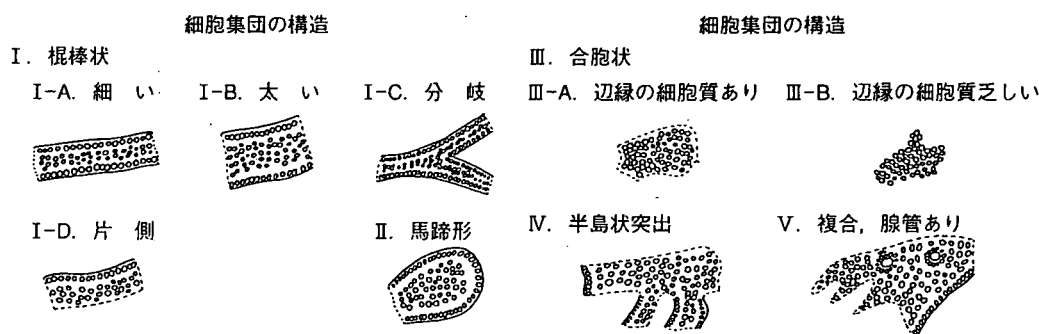
棍棒(導管)状または馬蹄形に出現する細胞集団において、棍棒の形態および棍棒周囲に付着して認められる細胞集塊に特徴があり、棍棒の幅が不

*1 きくち かずしげ: 聖マリアンナ医科大学産婦人科 (〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1)

*2 おの あきこ, ほしかわ さきこ: 聖マリアンナ医科大学病院病理

表1 各種内膜細胞採取法の長所・短所

採取法	採取器具	長所	短所
吸引法	吸引シリンジ付ポリ エチレンチューブ	・挿入率が高い ・疼痛が少ない ・卵巣癌細胞の検出に優れている	・症例によって採取細胞量が少ない ・血液、粘膜で厚く覆われる標本が やや多い
擦過法	エンドサイト エンドサーチ	・採取細胞量が多い ・粘液の混入が少ない ・むらなく細胞集塊を認める	・挿入率がやや低い ・疼痛を訴える例がある ・細胞重積性が著明でときに診断し 難いことがある
	スクリーブラシ	・細胞重積性がさほど著明でなく診 断しやすい ・エンドサイトより挿入率が高い ・扁平上皮の混在率が低い	・採取細胞量がやや少ない



細胞集団の所見

	構造	最外層の核の配列	核の重積性
増殖期内膜	棍棒状(細)	規則	+
嚢胞性腺増殖症	棍棒状(細, 太), 馬蹄形	規則	++
腺腫性増殖症	棍棒状(太, 分岐), 馬蹄形, 半島状突出, 複合	やや不規則	+++
異型増殖症	合胞状(細胞質乏しい), 半島状突出, 複合	不規則, 核の突出	++
内膜型腺癌 高分化型	合胞状(細胞質乏しい), 半島状突出, 複合	不規則, 核の突出	++

核, 核小体の所見

	核						核小体	
	面積 (μm^2)	大小不同	楕円形	不定形	クロマチン 濃染性	クロマチン 不均一分布	頻度	大型 (直径 $\geq 2.5 \mu\text{m}$)
増殖期内膜	36	±	14%	0%	±		6%	0%
嚢胞性腺増殖症	35	±	29%	0%	++		6%	0%
腺腫性増殖症	40	+	35%	1%	+++	±	11%	2%
異型増殖症	50	++	34%	2%	++	+	41%	4%
内膜型腺癌 高分化型	59	+++	53%	10%	+~++	++	83%	5%

図1 子宮内膜増殖症~子宮内膜癌の細胞像⁹⁾



図2 内膜増殖症の細胞像

均一である。しかし、核の形状・核の大きさ・核クロマチン構造・細胞質などの所見からは単純型子宮内膜増殖症の特徴的所見を得ることは困難であり、増殖期内膜細胞との鑑別は難しい(図2-1)。

2) 複雑型子宮内膜増殖症(旧腺腫性増殖症)

太い棍棒状の細胞集団が分岐を伴ったり、馬蹄形や半島状に突出する集団が目立つようになる。集団を構成する最外層の核はやや不規則となり、核の重積性も著明となる。核の大小不同やクロマチンの濃染、小型の核小体がみられるようになる(図2-2)。

3) 異型子宮内膜増殖症(単純型/複雑型を含む)

重積性を示す異型腺細胞の集団であり、細胞質の乏しい合胞状の細胞集団の出現や、半島状突出なども目立ってくる。さらに各種の複合したタイプの細胞集団のなかに腺が存在するようなパターンも認められる。細胞集団最外層核の不規則な配列、核の重積性も顕著にみられる。核所見では、大小不同・不整がみられるものの核小体は小型で



1. 単純型子宮内膜増殖症(弱拡)
膨大した腺開口部が明瞭にみられる。構成細胞に異型を認めず、組織型を容易に推定し得る。
2. 複雑型子宮内膜増殖症(弱拡)
腺開口部を囲んで微小核小体を持つ軽度異型腺細胞が密集している。
3. 単純型異型子宮内膜増殖症(弱拡)
重積性を示す細胞集団の辺縁部をみると核は腫大するが円型で均等、核小体も小さく、核の外方突出もみられない。

ある(図2-3)。

4) 子宮類内膜腺癌高分化型

異型子宮内膜増殖症の所見に加え、クラスターにおける最外層核の突出・核形不整・核縁肥厚・クロマチンの不均等分布・複数の核小体・腫瘍壊死性背景などの所見が著しく、かつ辺縁不整樹状の細胞集塊が出現する(図3-1)。

5) 子宮類内膜腺癌低分化型

核の大型化、高度の大小不同性、核内の白色化(euchromatinの著明な増加)・大型核小体・孤立散在化・ごく少数の正常内膜細胞の混在・顕著な腫瘍壊死性背景・多数の組織球の出現などである(図3-3)。

なお、そのほかの組織型については誌面の都合で他稿に譲る。

子宮内膜組織診

1. 子宮内膜組織採取法

キューレットを用いて子宮内膜壁を搔爬し組織