

〔原著〕 簡易顕微分光計による子宮癌細胞診自動化の研究

守 矢 和 人*

(昭和47年7月28日受付)

要 旨

子宮癌細胞診において、悪性細胞の特長を、核異型、核多型性、核縁肥厚、核多染性、核質粗大顆粒、核細胞質比の増加などの諸点を注目して我々は診断を下している。しかし、これらの所見はしばしば主観的に判定され易いので、細胞診を客観化し細胞診の自動化につながる方法について研究した。従来用いられていた顕微分光計を細胞診用に簡易化し、良性悪性の核が重複する16~25 μ の範囲の核径に合わせて10段階のスポットを作製し、これを問題の細胞核に外接させて核ヘマトキシリン陽性物質総量が一度に測定出来るよう工夫した。本器械を用いて診断に供すると、一定以上の大型濃染核は良性スミアにはみられず、癌にのみ出現する事実により客観的子宮癌細胞診に有効な成績を得た。396例中の盲試験の結果、良性例では95.9%、悪性例では96.4%の正診率を得た。さらに、細胞の形態、分化の程度、変性度などの所見と核ヘマトキシリン陽性物質総量の関係を、良性・悪性例について比較検討し、細胞診断上有意な結果を得た。

Keywords: 顕微分光計, 子宮癌細胞診自動化, 吸光度, 総量値, ヘマトキシリン陽性物質

略語一覧: Pap.; Papanicolaous 分類

序 文

子宮癌の早期診断における細胞診の重要性はすでに確立され、常用診として普及している。細胞診、組織診、コルポスコープの3者のうち、最も簡易な方法で、反復施行出来ること、患者に苦痛を与えないこと、広い範囲を擦過して検査出来ることなどの長所を有しているが、反面、悪性細胞の診断基準が判定者により異なる場合があることが指摘されている。この細胞診断における判定の主観性を排し、なるべく客観化することが望まれている。

著者はこの第一歩として、つぎのような基礎実験を行ない、顕微分光計 (Microspectrophotometer) を用いて診断を下す方法を検索した。

基 礎 実 験

1. 最大吸光波長の決定

顕微分光計によるヘマトキシリン陽性核質量を定量するため、最も適当な可視光線の波長がまず検索の対象となる。分光計により、ヘマトキシリン溶液の最大吸光波長を測定すると、図1の如く520 $m\mu$ にピークが認められ、500 $m\mu$ 以下では著明に低下し、440 $m\mu$ 以下で最低線をたどる。エオジンについても、同様の検索を行なってみると、390 $m\mu$ と540 $m\mu$ に2つのピークがみられ、その間、470 $m\mu$ で最低を示す。ヘマトキシリンに比べて波長による吸光度の差が少ない。520 $m\mu$ の波長でヘマトキシリン単染色した場合と、ヘマトキシリン・エオジン重染色した場合の2つをとってみると、エオジンが濃染する場合、核と細胞質の重積する部分で誤差が出る

* 千葉大学医学部産科婦人科学 (主任: 御園生雄三教授)

KAZUTO MORIYA: Auto screening of cytological specimen in uterine cancer by modified microspectrophotometer.

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Chiba University, Chiba.

Received for publication, July 28, 1972.

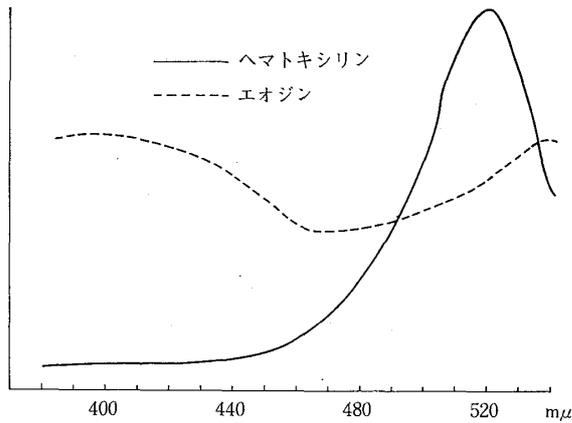


図 1. 色素の波長別吸光度
縦軸：吸光度 (A.U.)

ことが考えられる。そこで、エオジン染色は誤差を最小にするため、最淡染にとどめ、核細胞質をみるための細胞輪廓識別に供し、ヘマトキシリン最大吸光波長の 520 mμ をもって測定することに決定した。

2. ヘマトキシリン陽性物質の定量

オリンパス製・小穴一直良型顕微分光計を用い、水銀輝線スペクトル 520 mμ の波長により核ヘマトキシリン陽性物質の定量を試みた。光学系メカニズムは図 2 に示すとおりである。標本は子宮頸部より擦過採取せる腔分泌物を使用し、スライドカバーガラスに塗抹し、室温にて、

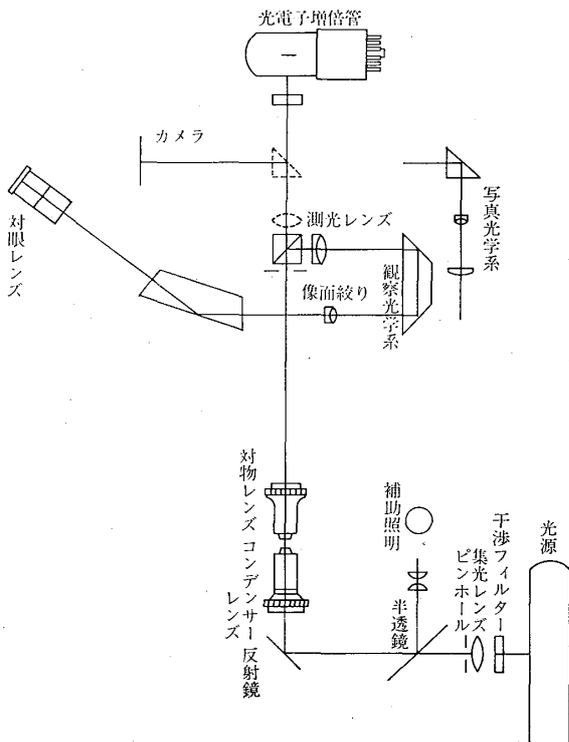


図 2. 顕微分光計光学系メカニズム

エタノール固定後、マイヤーのヘマトキシリン染色を施行 (弱エオジン染色を併用), Biolite で封入した。スライドガラスの厚さはいずれも顕微分光計の光学系に準じ、厚さ 0.17 mm のものである。コンデンサーレンズ、対物レンズ、ともに 100 倍を用い、油浸系で観察、核の直径 3 分の 1 以下の小光束が核の中央部を通るようにした。表 1 は前述のようにして測定した吸光度と核半径の二乗の積 $r^2 \cdot E$ をもってヘマトキシリン陽性物質の相対含量とした。図 3 は、このようにして測定した吸光度を核の大きさの関連において表わしたものである。材料は良性細胞群で核の肥大などを有するものも含まれる。縦軸に吸光度、横軸に核長径と短径の和を示している。吸光度最大が 50 を超すものはほとんどなく、核長短径和も 30 を超すものは少ない。核が大きくなれば吸光度は漸減する傾向を示す。図 4 は同様に、吸光度と核の大きさの関係を悪性細胞について表わしたもので、吸光度が 50 を超す細胞群が過半数を占め、核長短径和も 40 を超すものが圧倒的に多い。核が大きく、しかも吸光度が高

表 1. ヘマトキシリン陽性物質相対含量の算定原理

$$c = \frac{k(\lambda) \cdot E}{2-r} \quad m = \frac{2\pi}{3k(\lambda)} \cdot r^2 E$$

- c: 球状透光体の吸光物質の濃度
- r: 球状透光体の半径
- m: 球状透光体中の吸光物質の全含量
- E: 吸光度
- k(λ): 吸光物質 測定波長 λ に特有な定数

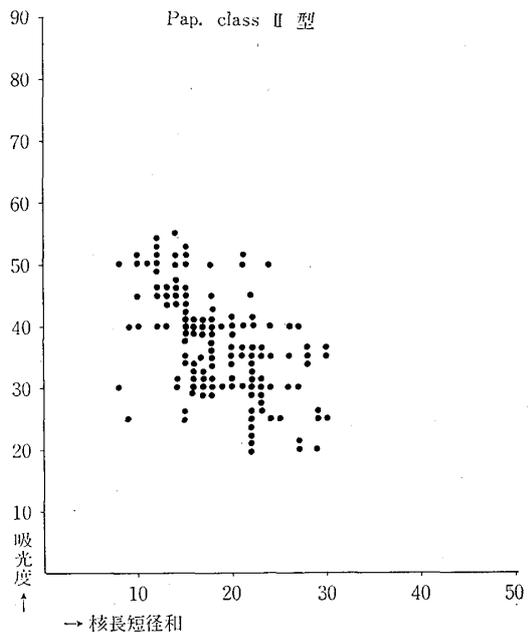


図 3. 核の大きさ (核長短径和) と吸光度の関係

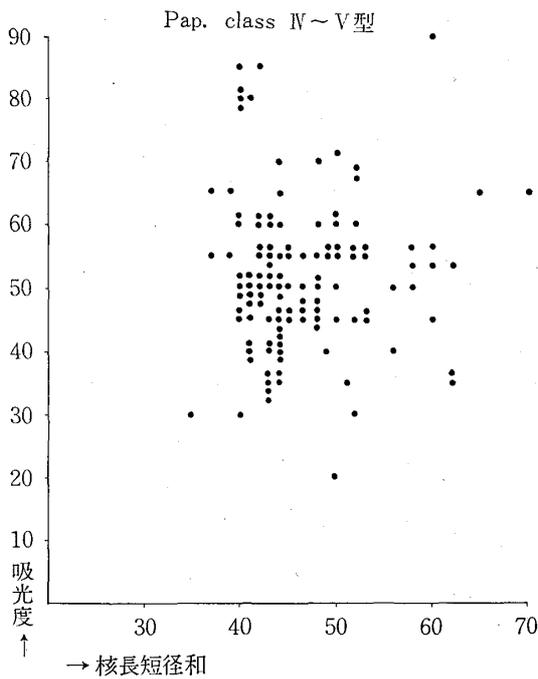


図 4. 核の大きさ (核長短径和) と吸光度の関係

い細胞が多数みられ、核が大きくなっても吸光度が漸減しない点で、良性群と異なっている。前述の顕微分光計を用い、良性悪性核についてスポットの scanning による計測も試みた。波長は同じく、520 m μ の水銀灯を用い、スポットは 1.6 μ の大きさのものを使用した。核の中心を通り長径に沿って毎分 30mm のスピードで scanning した。良性と悪性核にみられる一般的な差異は、シェーマの図 5 に示すように、a の山の高さで表わ

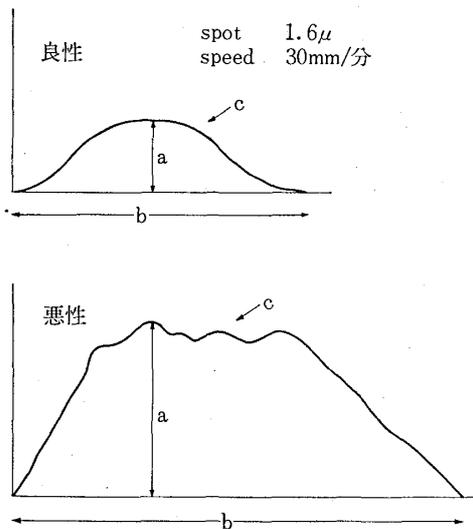


図 5. Scanning
縦軸：吸光度 (A.U.)

される核の濃染度によるもの、b の底辺の長さで表わされる核の大きさによるもの、c の山頂が平滑か凹凸かによるものなどによって表わされる。c はクロマチンの分布が不均等であることによる。第 4 の因子として、山が左右非対称であることも、悪性の場合には、ときに見出される。以上の所見は必ずしも直ちに良性悪性の差異を示すものではないが、細胞形態を図表に客観的に表現出来るという点で妙味があり、将来細胞診自動化に応用する上の一つのポイントになる。

3. 簡易顕微分光計の作製

基礎実験 2 の成績に基づき、良性細胞と悪性細胞を比較すると、後者に大型濃染核が多いこと、換言すると、良性では小型核で濃染するもの、大型核で淡染するものはあるが、大型濃染核はほとんどみられない事実を細胞診自動化に応用し、しかも、その測定を実用目的のため、簡易化する必要性を痛感した。そこで従来の小スポット測定値積分法を改良し、核に外接するスポットを作製、核染色物質総量を一度で測定出来る方法を考案し、オリンパス光学の協力で器械化した (図 6)。スポットの大きさは良性核と悪性核が重複する 16~25 μ の範囲とし、これを 10 段階に分けて各スポット番号をつけた。スポット番号と核径の大きさとの関係は表 2 に示した。

4. 染色時間による総量値の差異

染色条件の違いにより染色結果が非常に変動し、これが総量値に影響する恐れがあるので、染色時間が最も安定しているマイヤーヘマトキシリンを選び、同一例から同時に採取した標本につき、染色時間を変えて総量値に

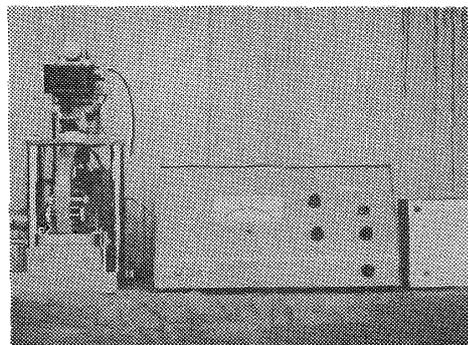


図 6. 簡易顕微分光計

表 2. 簡易顕微分光計におけるスポット番号およびスポット径の関係

スポット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
スポット径 (μ)	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

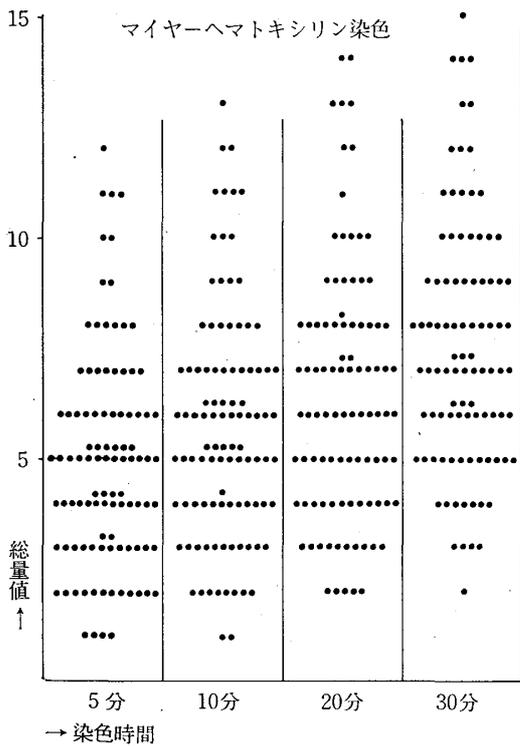


図 7. 染色時間の差による総量値の比較 (非癌)

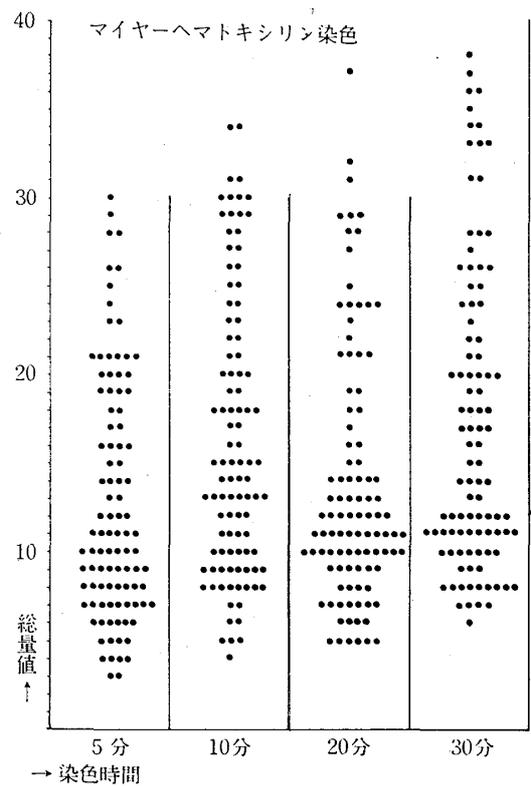


図 8. 染色時間の差による総量値の比較 (癌)

どれだけの差異が出るかを比較したのが図7, 図8である。図7は非癌例, 図8は癌例で, 5分, 10分, 20分, 30分の4種を比較した。なお, 総量値とは, 簡易顕微分光計で測定したヘマトキシリン陽性物質の総量で, 吸光度が核の大きさで自動的に積分された値である。図7の非癌例で, 5分および10分では, 総量値が3~7に集中し, 20分では3~8に, 30分では5~9に集中して, 総量値に多少のずれはあるが, 染色時間による差は少ない。図8の癌例についても, 染色時間が長くなるにつれ, 軽度の総量値の上昇がみられるが, その差は著明でない。染色時間にして, 5分から30分の差は非常に大きいものであり, それにも拘らず総量値に差が少ないことは, 本法を用い, 試薬の作製法を一定にし, かつ一定期間の使用だけに限った場合には (長期間使用すると水で薄められる), 安定した染色方法とみてよいであろう。

実験材料および実験方法

実験材料は, 千葉大学産科婦人科の外来および入院患者 396 例について採取したスミアで, 表3のように, 子宮頸癌 I 期から III 期 76 例, 上皮内癌 8 例, 異型上皮 26 例, その他良性群 286 例である。これらのうち, 良性群を除き他はすべて組織診断で確認されたものである。ただ軽度の異型上皮の一部は, 細胞像からこれが推定さ

れるのみで, 組織診では確認のないものも含まれている。

実験方法は, 前述の標本について, 室温にて, エタノール固定後, マイヤーヘマトキシリンにより 10 分間染色, Biolite 封入後, 簡易顕微分光計により, 吸光度および総量値を測定した。吸光度とは, この場合, 核の

表 3. 実験材料 (臨床診断と細胞診断)

臨床診断	パパニコロウ分類					計
	I型	II型	III型	IV型	V型	
子宮頸癌 III				9	10	19
子宮頸癌 II			2	16	14	32
子宮頸癌 I			3	16	6	25
上皮内癌		1	4	3		8
高度異型上皮		1	4	1		6
中等度異型上皮		3	4			7
軽度異型上皮	2	10	1			13
頸管ポリープ	18	6	2			26
膺 炎	28	11	5			44
子宮腔部ピラン	137	31	3			171
妊 娠	8	1	1			10
そ の 他	25	8	2			35
計	218	72	31	45	30	396

大小にかかわらず、スポット番号1により測定した値である。したがって、これより大きい核については、核の中心部にスポットを当て、一定の面積の吸光度を測定することになる。総量値とは、前述したように、核に外接するスポットを選び測定した値である。

実験成績

良性悪性の細胞形態と吸光度の関係をみると、図9のように、まず良性群では、最高値17以内にあり、頸管型細胞と扁平上皮深層型細胞は大差ない。中間層型細胞は分布の幅が狭くなる。悪性群では、吸光度17を超えるものが約半数を占め、30以上の高値もみられる。有尾型、分化型にやや低い傾向をみるが、線維型、裸核は未分化型と同様高値のものが含まれる。裸核は最も分布の幅が広く、5以下の淡染から36に及ぶ濃染まで、核染色性のVarietyが認められる。細胞形態と総量値の関係をみると、図10のように、良性群では、頸管型細胞および深層型細胞とも5~20の範囲に分布し、20を超えるものはみられない。中間層型細胞は、これよりやや低い値を示す。悪性群では、裸核、未分化型が総量値も高

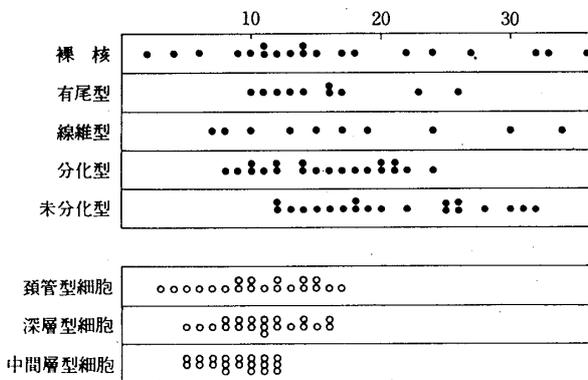


図9. 細胞形態と吸光度

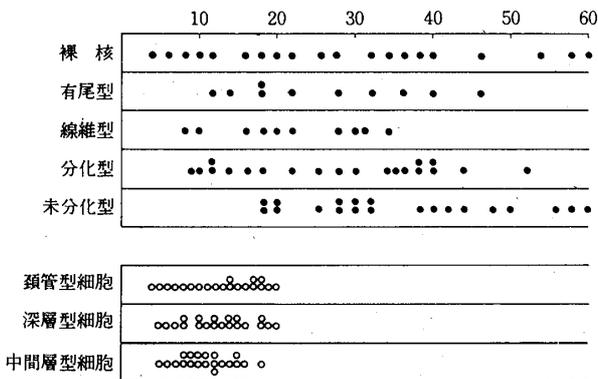


図10. 細胞形態と総量値

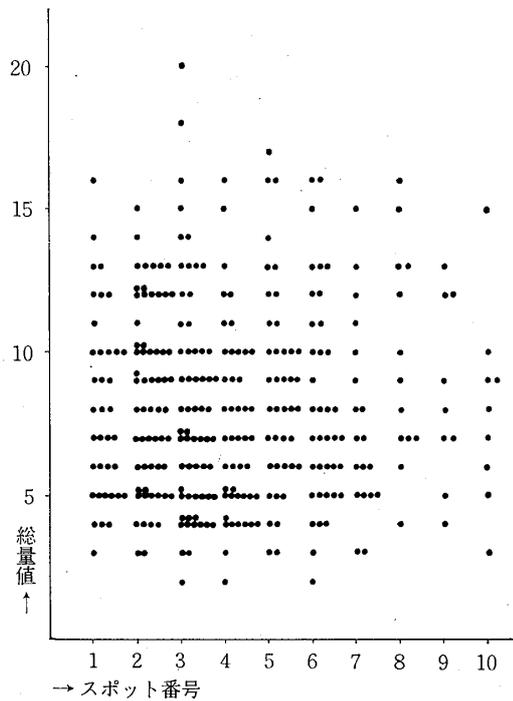


図11. 各種非癌病変例における総量値とスポット番号の関係

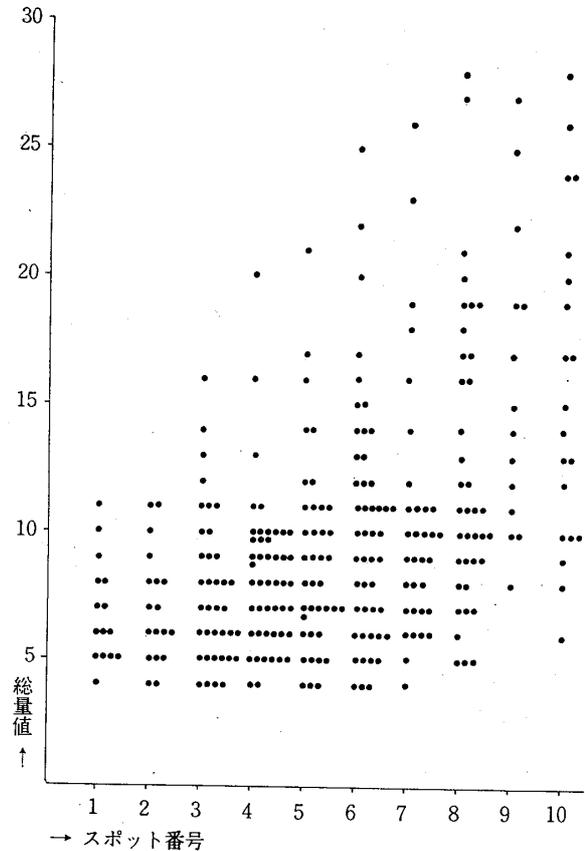


図12. 上皮内癌例における総量値とスポット番号の関係

く、分化型がこれに次ぎ、有尾型、線維型の順になる。吸光度と総量値の間に順位の逆転がみられたのは線維型で、吸光度はかなり高いのに対し、総量値は相対的に低くなっているが、これは核濃縮型が含まれるためである。非癌病変で、総量値がどれだけ高値まで認められるかを明らかにするため、組織学的に癌を否定された細胞診 III 型および IIb 型例の一部について検索した。これらの内容は異型上皮のほか、良性増殖上皮、各種炎症性変化例が含まれている。図 11 のように、総量値 20 を超すものはなく、スポット番号が大きくなっても、換言すると、核が大きくなっても、総量値がほぼ一定である。上皮内癌 (図 12) では、総量値 28 に至る増加がみられ、しかもスポットの大きい大型核で、高値を示す割合が良性より増加してくる。進行癌 (図 13) では、総量値が 5 ~ 50 まで幅広い分布を示しており、とくに 20 を超すものがほぼ半数認められる。つぎに核質像と総量値との関係を図 14 に示した。良性群では、細網状、細顆粒状、無構造に分け、悪性群では、細網状、細顆粒状、粗網状、粗顆粒状、無構造に分類し、比較検討した。良性群では、細顆粒状、無構造がほぼ類似した値を示し、細網状が一般に低値を示すが、無構造もやや低値を示す。悪性群では、無構造がとくに高値を示し、粗顆粒状がこれに次ぎ、細顆粒状の順になり、細網状、粗網状は低値になっている。各症

例ごとに総量値の分布を検討してみると図 15 のようになる。総量値の高いものから 30 核を選び、ヒストグラムに表わしたものである。良性例の多くは、総量値 3 ~ 4 にモードを認め、異型上皮では、これより総量値が増加し、9 ~ 10, 11 ~ 12 にモードを示すものがしばしば出現する。上皮内癌 (図 16) では、さらに総量値が全体的に高く、モードを示す値が一点に集中しない。進行癌では、総量値の分布がきわめて幅広いことが特徴で、30

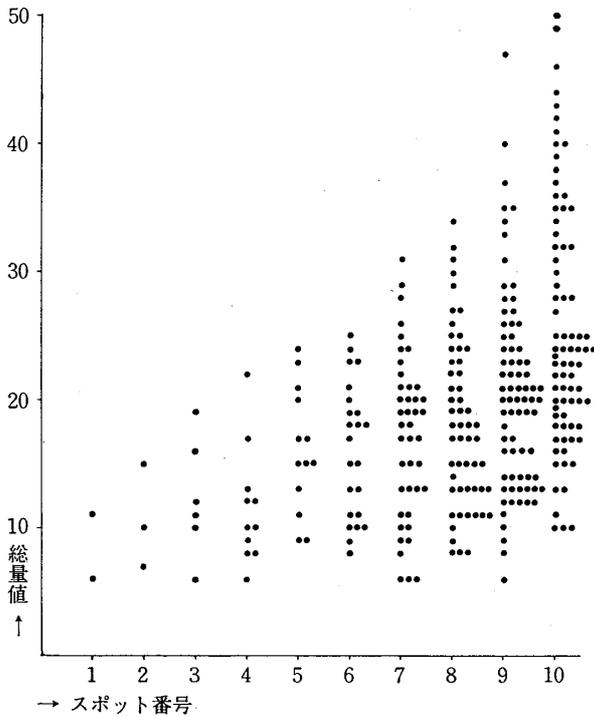


図 13. 進行癌例における総量値とスポット番号の関係

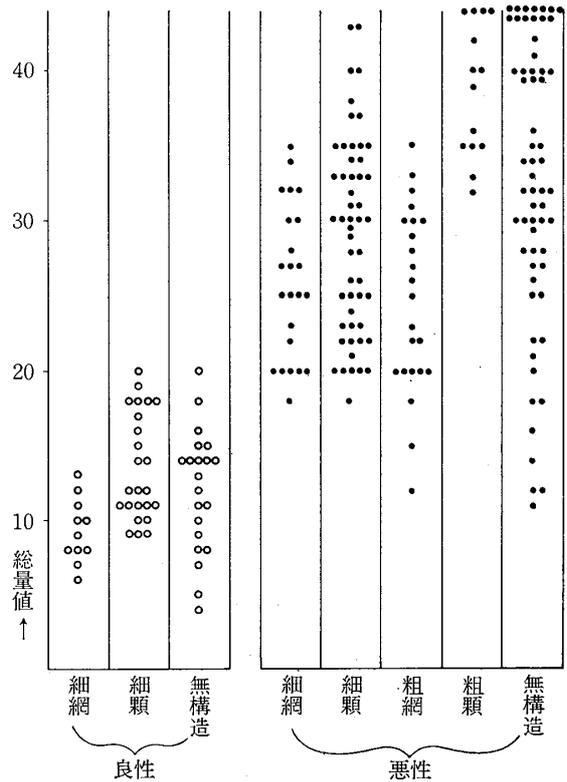


図 14. 核質像と総量値—良性悪性の比較—

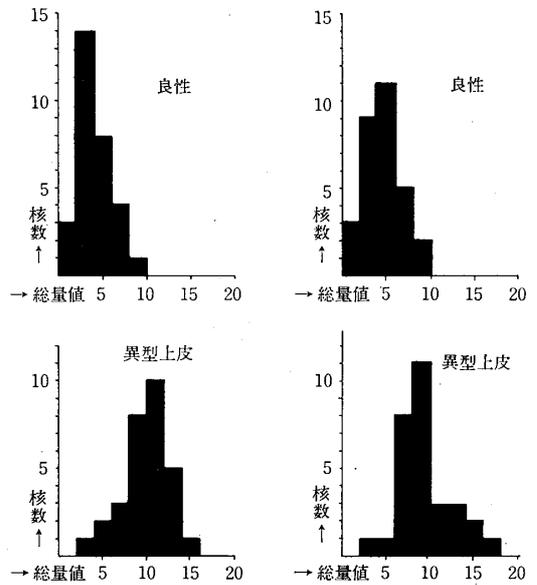


図 15. 総量値ヒストグラム (各症例)

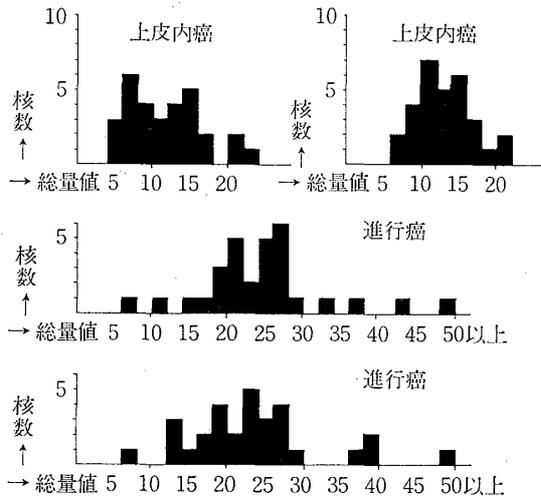


図 16. 総量値ヒストグラム (各症例)

を越す高値のものも散見する。

診断総成績

臨床診断を隠した標本について、所謂盲試験により、本器械の診断成績を検討した。悪性群はこのうち84例で、上皮内癌8例、臨床癌I期、II期、III期各々25, 32, 19例より成る。良性群は286例で、その内訳は、子宮腔部ビランが最も多く171例、腔炎44例、頸管ポリープ26例、妊娠10例で、その他各種良性疾患例35例である。異型上皮は、軽度、中等度、高度各々13, 7, 6例で全体として26例より成る。総量値26以上を+, 25~21を±, 20以下を-, として表4をみると、悪性例では、84例中、+は74例、±は7例で、3例の誤陰

表 4. 臨床診断と本装置による判定成績

	例数	+	±	-
子宮頸癌 III	19	18	1	0
子宮頸癌 II	32	29	2	1
子宮頸癌 I	25	21	3	1
上皮内癌	8	6	1	1
高度異型上皮	6	2	3	1
中等度異型上皮	7	0	2	5
軽度異型上皮	13	0	2	11
頸管ポリープ	26	0	1	25
腔炎	44	1	2	41
子宮腔部ビラン	171	1	5	165
妊娠	10	0	0	10
その他	35	0	2	33
計	396	78	24	294

性となる。良性例では、286例中、-は274例、±は10例で、2例の誤陽性となる。異型上皮では、26例中、-は17例、±は7例、+は2例となる。

考 察

細胞診自動化の試みは、1959年 Bostrom¹⁾²⁾³⁾らにより発表され、flyingspot の走査で得られた情報を、コンピューターに解読させる Cytoanalyzer を用いたが、実用的に満足する成績は得られていない。自動化の因子として、

- 1) 試料の染色
- 2) 悪性細胞の特徴の定量化
- 3) 情報の処理

の段階を踏むが、2)については悪性細胞の核 DNA を対象にすることが一般的である。Leuchtenberger⁴⁾は、組織の種類に関係なく、同一個体の DNA 量は、体細胞と生殖細胞2対1で、癌細胞はこれらより増量していることを証明した。牧野⁵⁾は、所謂 Stemline 説を発表し、DNA 量と染色体の間に一定の関係があることを認め、癌細胞における染色体数の増加と DNA 量の増加を明らかにした。

DNA 量測定の方法として Acridine Orange 蛍光測定法と Feulgen 染色による顕微分光法計測とがある。まず、前者については、L. Von. Bertalanffy⁶⁾⁷⁾(1956)により、Acridine Orange 染色法の DNA, RNA に対する蛍光特異性が確認され、Caspersson⁸⁾(1964)がこの蛍光を顕微分光法で利用し、DNA が 530 mμ の極大蛍光を放つことに注目した。さらに Wied⁹⁾¹⁰⁾ Rigler¹¹⁾らは、これを細胞診自動化に応用し、本邦でも、田中¹²⁾の報告例がある。後者の顕微分光計による核 DNA 定量は、Caspersson⁸⁾以来、Naora¹³⁾ Ris¹⁴⁾ Leuchtenberger¹⁵⁾などにより、その確実性が実証され、本邦においても、御園生、安里¹⁶⁾、野嶽、後藤¹⁷⁾、和泉¹⁸⁾などが、子宮頸部細胞および組織について定量的研究を行なっている。

著者は、まず分光計によるヘマトキシリン溶液の最大吸光波長を計測することから出発し、エオジン溶液の吸光度との関連において、520 mμ が測定光線の波長として最適であることを確認した。従来の顕微分光計を用いる基礎的検討で、良性細胞核では、核の大きさが増すにつれて、吸光度が減少するのに対し、悪性細胞核では、大型濃染核が認められることに注目した。後藤¹⁷⁾は、Feulgen 染色による顕微分光計測で、パパニコロウ I 型、II 型の細胞について、そのほとんど全部が2倍体に属し、核 DNA 量がほぼ一定していると述べているが、

これは著者の成績と同様の意味を表わすものであり、Feulgen 染色による DNA 定量成績とヘマトキシリン陽性物質の定量がほぼ同様の結果を得たことになる。さらに、後藤¹⁷⁾は、パパニコロウ IV 型、V 型についても、著者と同様の意味で、DNA 量の増大を認めている。以上の事実に基づき、吸光度のみで比較するよりも、また核の大きさのみで比較するよりも、両者の積で比較する方が良性悪性の間に差異が認められることを器械化したのが著者のポイントである。著者の診断成績をみると、総量値 25 を + と ± の閾値とし、20 を ± と - の閾値とすると、悪性例 84 例中、+ が 74 例、± が 7 例、- が 3 例で、誤陰性はわずか 3.57% になる。良性例では、286 例中、- が 274 例、± が 10 例、+ が 2 例で、誤陽性は 4.6% となる。後藤¹⁷⁾も従来の顕微分光計を用いた方法で、癌の全例に少なくとも、DNA 量 24 以上の細胞が存在し、最高値 20 以下の症例では、すべて癌が否定される、として DNA 定量の診断的価値を認めているが、Feulgen 染色を用いなくても、日常染色に常用されているマイヤーヘマトキシリン標本で Feulgen 染色と同様の成績を得たこと、また、われわれの装置が従来の顕微分光計による測定時間の数十分の一の労力と時間で求められる点に臨床的な意義がある。

他の細胞診自動化による診断成績を参照すると、顕微螢光測光法による田中¹²⁾の値は、浸潤癌 40 例がすべて螢光度 20.37 を超し、38 例 (95%) が螢光度 37.63 を超えるのに対し、良性例の 94.59% は 20.37 以下で、パパニコロウ法の診断とほぼ一致したという。岸上¹⁹⁾らのテレビカメラによる自動装置では、203 個の扁平上皮癌細胞のうち、93 個 (51%) は、濃度 10~40% で赤ランプ、71 個 (35%) は、同じく黄色ランプ、20 個 (10%) は、濃度 40~60% で赤ランプ、6 個 (3%) は、同じく黄色ランプで、結論として、203 個の癌細胞のうち 190 例 (94%) がチェックされたとしている。他方、良性異型細胞 240 個のうち、223 個 (93%)、扁平上皮細胞核 973 個のうち、876 個 (90%) は本装置にかからなかった。これらの成績は、著者の成績とほとんど大差ない結果で、現在の各種自動化の技術では、この程度の誤陰性が出現するのは技術的限界としてやむを得ないものであろう。誤陰性の原因として考えられることは、採取技術上の条件のほかに、癌細胞の変性による核 DNA 量の低下が著しい場合などである。

さらに器械化した本装置は、ヘマトキシリン陽性物質量を、数量的、客観的に表現することにより、良性悪性細胞の性格分析にも資するところが多い。有尾型や分化型の癌細胞は、吸光度、総量値とも、平均より低値を示

すが、これは有尾型細胞に変性を伴う細胞が多いこと、また分化型細胞についても、癌細胞の分化に伴い、変性と同様、ヘマトキシリン陽性物質の減少があることを示している。線維型は、吸光度は高いが、総量値は比較的 low、これは核濃縮と関係があると解釈される。未分化型癌細胞は、吸光度および総量値とも高値を示すが、これは本細胞が核 DNA 量が多いと同様、ヘマトキシリン陽性物質が多いことの裏付である。裸核癌細胞は、吸光度および総量値とも低値から高値まで広い幅を示したが、裸核でヘマトキシリン陽性物質が高値を示すものは、良性細胞裸核との間に、非常に大きな差異を示し、診断的意義は大きいと考えられる。良性細胞裸核は、例外なく低い総量値を示すからである。総量値とクロマチン構造を対比した成績では、良性核無構造は、すべて低値を示すのに、悪性核無構造は、高値から低値まで幅広い点が注目される。核無構造は、細胞標本乾燥による人工的所見もあるが、われわれの正確に作製した標本では、そのような恐れはなく、細胞の退行変性による所見を表わしていると解釈される。すなわち、癌では、ヘマトキシリン量の減少がまだそれ程著しくない段階において、核の無構造化が表わされる点に興味がある。

稿を終わるにあたり、終始懇篤なご指導を賜った御園生雄三教授に深甚な謝意を表するとともに、直接ご指導下さった武田敏博士に感謝致します。なお本論文の要旨は、第 8 回、第 9 回日本臨床細胞学会総会、第 10 回日本臨床細胞学会総会シンポジウム、第 37 回日産婦関東地方部会で発表した。

本論文は千葉大学審査学位論文である。

SUMMARY

In cytological diagnosis of cervical cancer of uterus, final decision is given by general survey of complicated nuclear characters; such as nuclear atypia, pleomorphism, polychromasia, thickening of nuclear membrane, coarse chromatin structure and increased nucleocytoplasmic ratio. These factors, however, often consist of subjective naming of cytological findings, so studies were made on objective, auto-screening of cytological specimens.

Microspectrophotometer, used for fundamental research, was modified for cytological diagnosis in the following device. The ranges of

benign atypical cells and malignant cells have common area between 16~25 μ in nuclear diameter. Spots of 10 steps, sized between 16~25 μ , were attached to microscope, in order to adapt to outer border of the nucleus to be measured. Electronic device succeeded in determining total amount of hematoxylin positive substance in the nucleus, in other words, integrated value of staining intensity by nuclear size. Abnormal titers of hematoxylin positive substance, represented by large nucleus with strong intensity, are objectively recorded in this apparatus, to the diagnosis of malignant cells. Blind tests applied to 396 cases proved 95.9% accuracy in benign group and 96.4% in malignant group. Further studies were attempted on the correlation between total amount of hematoxylin positive substance and cellular differentiation and degeneration.

文 献

- 1) Bostrom, R. C. Sawyer, H. S. and Tolles, H. E.: Instrumentation for automatically pre-screening cytological smears., Proceedings of the ire., 1895-1900, 1959.
- 2) Tolles, W. E. and Bostrom, R. C.: Automatic screening of cytological smears for cancer., Ann N. Y. Acad. Sc., 63, 1211-1218, 1955.
- 3) Spencer, C. C. and Bostrom, R. C.: Performance of the cytoanalyzer in recent clinical trials., J. Natl. Cancer Institute, 29, 267-276, 1962.
- 4) Leuchtenberger, C. and Leuchtenberger, R. and Davis, A. M.: A microspectrophotometric study of the DNA content in cells of normal and malignant human tissues., Am. J. Pathol., 30, 65-85, 1954.
- 5) Makino, S.: The chromosome cytology of the ascites tumors of rats, with special reference to the concept of the stemline cell. Int. Rev. Cytol, 6, 25-84, 1957.
- 6) von Bertalanffy, L.: Use of acridine-orange fluorescence technique in exfoliative cytology., Science, 124, 1024-1025, 1956.
- 7) von Bertalanffy, L. and Bickis, I.: Identification of cytoplasmic basophilia RNA by fluorescence microscopy., J. Histochem. Cytochem., 4, 481-493, 1956.
- 8) Caspersson, T.: II Internatl. Congr. Histo and Cytochem., 88, 1964.
- 9) Wied, G. L. Messina, A. M. Meier, P. and Blough, R. R.: Fluorospectrophotometric analyses on cervical epithelial cells., Acta Cytol., 8, 61-67, 1964.
- 10) Wied, G. L. Messina, A. M. Mangano, J. I. Meier, P. and Blough, R. R.: Fluorospectrophotometric analyses of endometrial and endocervical epithelial cells., Acta Cytol., 8, 408-415, 1964.
- 11) Rigler, R.: Microfluometric characterization of intra cellular nucleic acid and nucleoproteins by acridine orange., Acta Physiol. Scand., 67, Supplement 267, 1-122, 1966.
- 12) 田中一静: Fluorospectrophotometryによる塗抹細胞診断の客観化に関する研究, 日臨細胞誌, 10, 155-173, 1971.
- 13) Naora, H.: Microspectrophotometry and cytochemical analysis of nucleic acids., Science, 114, 279-280, 1951.
- 14) Ris, H.: Quantitative cytochemical determination of DNA with the Feulgen nuclear reaction., J. Gen. Physiol., 33, 125-146, 1949.
- 15) Leuchtenberger, C., Klein, G. and Klein, E.: The estimation of nucleic acids in individual isolated nucleic of ascites tumors by ultraviolet microspectrophotometry and its comparison with the chemical analysis., Cancer Res., 12, 480-483, 1952.
- 16) 御園生雄三, 安里 洋: 核酸顕微測光法によるDNAの研究, 第16回日本産科婦人科学会宿題報告要旨, 54-63, 1964.
- 17) 後藤忠雄: 産婦人科領域における腔内塗抹細胞(一部捺印塗抹細胞)組織切片及培養細胞の核内DNA定量に関する研究, 日産婦誌, 20, 375-384, 1968.
- 18) 和泉元志: 子宮頸腔部各種病変におけるDNAの組織化学的研究, 日産婦誌, 20, 1469-1478.
- 19) 岸上義彦, 橋本良夫, 野村裕, 中村義文, 高橋隆, 服部正次, 横内 峻, 宮脇一男: 細胞診の自動化, 日臨細胞誌, 6, 232-237, 1967.