

報告番号	※乙	第	号
------	----	---	---

## 主論文の要旨

論文題目      New Diagnostic Technique for Rapid Fluorescence  
Immunocytochemical Staining of Adenocarcinoma and  
Mesothelial Cells Using Liquid-Based Cytology  
(液状処理細胞診を用いた腺癌と中皮の迅速蛍光免疫細胞染色による  
新しい診断法)

氏名            森本 亜由美

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

体腔液の細胞診検査の主目的は、貯留液中の悪性細胞検出にある。体腔液のうち腹水中に出現する悪性細胞は、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆道癌、及び卵巣癌などに由来することが多く、胸水では肺癌、乳癌、胃癌などの由来が多い。特に腹水では、胃癌、大腸癌などの消化管癌による癌性腹膜炎の頻度が高く、通常の腹水細胞診検査に加え、速やかに癌の浸潤の有無程度を明らかにし予後を推測するため、術中迅速腹水細胞診検査もしばしば行われている。漿膜下への癌浸潤、肝硬変、炎症性疾患などにより体腔液が貯留すると、中皮細胞は反応性中皮細胞となる。体腔液中の反応性中皮細胞は、孤立散在性に出現するもののほかに、大型細胞、マリモ状、乳頭状など大小さまざまな集塊も形成し、時として悪性細胞に類似する変化を起こす。また、リンパ球や組織球とともに癌細胞に付着することもある。そのため体腔液中の反応性中皮細胞と腺癌細胞は、時に鑑別困難なことがあり、長年に渡って細胞診断上大きな問題となっているが、いまだに的確な鑑別方法は確立されておらず、観察者の経験によるところが大きい。現在、両者の鑑別には免疫細胞化学が有用とされ

ているが、検体に制約があり免疫組織化学ほどは普及していない。また、術中迅速腹水細胞診検査は、主にパパニコロウ染色、ギムザ染色のみで診断しており、その診断精度は明らかではない。

液状処理細胞診(Liquid Based Cytology:LBC)は、細胞診材料を保存液中に保存して検査に用いる方法で、現在主に婦人科および尿細胞診を中心に用いられている。利点として、細胞の重なりが少ない均一な薄層標本の作製が可能のため鏡検がしやすいこと、保存液中の細胞は数週間から数年保存できるため、細胞形態学的な検査以外に免疫細胞化学的検索や分子生物学的検索等、複数の検査が可能であること等があげられ、日本においても徐々に普及しつつある。

本研究では、腹水細胞検体に対し、LBCを用い、酵素抗体法、迅速蛍光抗体法を行い、体腔液細胞診の補助診断としての有用性を検討した。

#### 【対象及び方法】

腹水細胞検体64例(術中腹腔洗浄液35例・腹水29例)を遠心分離して得た沈渣の一部で塗抹標本作製し、95%エタノールにて15分以上固定した後、パパニコロウ染色、PAS染色、ギムザ染色を行い通常の細胞診断に用いた。残りの沈渣をLBC試薬Liqui-PREP™保存固定液(Liqui-PREP™ Preservative Solution, LGM International, Inc.)に5分～1時間以上保存した。この保存細胞検体(LBC検体)でパパニコロウ染色、酵素抗体法を行うときは、染色に必要な量を遠心分離し、得られた沈渣に対して3～4倍量のセルベース(Liqui-PREP™ Cellular Base Solution, LGM International, Inc.)を加え、剥離防止付きスライドガラスに塗抹し室温乾燥した細胞標本を用いた。パパニコロウ染色は、通常の細胞診断時と同一条件の染色を行い、通常の塗抹標本と染色態度を比較した。酵素抗体法は、必要

に応じて pH6.0 10mmol/L クエン酸緩衝液にて5分間×3回マイクロウェーブ照射し抗原性賦活処理を行った。抗原性賦活処理を行った標本は、室温放冷した後、0.3%過酸化水素水加メタノールにて20分間内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、10%ヤギ正常血清にて20分間非特異反応阻止後、一次抗体を4℃で一晩反応させた。翌日ヒストファインシンプルステイン(ニチレイ)を30分間反応させ、DAB 基質キット (Vector Laboratories, Inc.) にて15～360秒間室温にて発色、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。なお、酵素抗体法は、腺癌マーカーである Ber-EP4、CEA、EMA、MOC-31、中皮マーカーである calretinin (monoclonal mouse, monoclonal rabbit)、cytokeratin5/6、desmin、D2-40、HBME-1、mesothelin、thrombomodulin、WT1 の発現を検討した。各マーカーの発現は陽性細胞の比率で、-: 0%, ±: <10%, +: 10～50%, ++: >50% の -から++の4段階に評価し、比較した。迅速蛍光抗体法は、LBC 検体に一次抗体 Ber-EP4 を直接混和し、直ちに5分間遠心分離した。上清除去後、沈渣に二次抗体1%FLUORESCCEIN ANTI-MOUSE IgG (Vector Laboratories, Inc.) PBS を混和して再び5分間遠心分離し、上清を除去した。この沈渣にセルベースを加え、混和後剥離防止付きスライドガラスに塗抹して冷風乾燥し、対比染色液 DAPI (Abbott Molecular Inc.) にて封入した。観察には DAPI / Green / Orangeトリプルバンドパスフィルター (Abbott Molecular Inc.) 付き蛍光顕微鏡 (OLYMPUS PROVIS AX80+DP-70) を用いて陽性細胞の有無を検討した。迅速蛍光抗体法は、術中迅速腹水細胞診への応用を目的としているため、腺癌マーカーBer-EP4 を用いて保存細胞液中で抗体反応を行い、検体提出から20分以内の染色を可能にした。なお、パパニコロウ染色、酵素抗体法と同様に LBC 検体を必要量遠心分離し、得られた沈渣に対して3～4倍量のセルベースを加え、剥離防止付きスライドガラスに塗抹し室温乾燥した細胞標本に、一次抗体 Ber-EP4 を60分間、二次抗体1%FLUORESCCEIN ANTI-MOUSE IgG PBS を60分間反応

させた通常の蛍光抗体法も行い、迅速蛍光抗体法と比較した。

### 【結果】

LBC 検体を用いたパパニコロウ染色標本は、通常のパパニコロウ染色標本とほぼ同様の細胞像であった。また、腹水細胞検体64例のパパニコロウ染色での診断は、腺癌13例、腺癌疑い7例、陰性44例であった。このうち、酵素抗体法の各マーカーの発現の、-と±を陰性、+と++を陽性とする、腺癌マーカーである Ber-EP4、CEA、EMA、MOC-31 の陽性率は腺癌例92% (12/13)、腺癌疑い例57% (4/7)、陰性例5% (2/44)であった。一方中皮マーカーである calretinin monoclonal mouse、calretinin monoclonal rabbit、cytokeratin5/6、desmin、D2-40、HBME-1、mesothelin、thrombomodulin、WT1 の陽性率は、腺癌例8~15% (1~2/13)、腺癌疑い例43~57% (3~4/7)、陰性例93~95% (41~42/44)であった。Ber-EP4 を用いた蛍光抗体法は、通常法、迅速法いずれも酵素抗体法で診断された腺癌細胞陽性18例全例で同様の陽性細胞を認めた。一方、腺癌細胞陰性46例には陽性細胞を認めなかった。

### 【考察】

LBC 検体を用いたパパニコロウ染色標本は、通常のパパニコロウ染色標本とほぼ同様の細胞像であり、液状処理細胞診(Liquid Based Cytology:LBC)は体腔液細胞診にも利用可能であることが確認された。パパニコロウ染色、PAS 染色、ギムザ染色のみを用いた通常細胞診断で、腺癌細胞陽性、陰性と診断した症例は、酵素抗体法でもそれぞれ腺癌マーカー、中皮マーカーが高率に陽性となり、診断を支持する結果となった。疑陽性と診断された症例も酵素抗体法を用いることで腺癌と中皮に明瞭に鑑別することができた。このことは、腹

水細胞検体を LBC 保存固定液に保存することで、診断に必要とされるほとんどの抗体の酵素抗体法が可能となり、通常の染色のみでの細胞診断と比較して、かなりの診断精度が得られることを示唆している。

本研究で行った Ber-EP4 を用いた迅速蛍光抗体法の大きな特徴は、保存固定液中の細胞をスライドガラスに塗抹するまでの遠心分離のステップを利用して抗体反応を行ったこと、つまり液層で抗体反応を行ったことである。それにより染色時間を大幅に短縮し、検体提出から20分以内で結果報告可能となった。さらに通常の蛍光抗体法、酵素抗体法と遜色なく同じ結果が得られたため、本法の術中迅速腹水細胞診検査への応用が期待される。

#### 【結語】

本研究は、長年に渡って細胞診断上大きな問題となっている反応性中皮細胞と腺癌細胞の鑑別をより明確にすることを目的として行った。LBC を用いた酵素抗体法、蛍光抗体法はともに有用な結果を得ることができた。特に迅速蛍光抗体法は、現在主にパパニコロウ染色、ギムザ染色のみで行われている術中迅速腹水細胞診検査に併用して用いることで、より高い診断精度が得られることが示唆される。