

体腔液細胞診の核形態計測と免疫細胞化学的検討

平川栄一郎^{1)*}, 山本康子¹⁾, 森田泰博¹⁾, 藤本千草¹⁾,
中野正行²⁾, 塩岡忠夫²⁾, 白石誠²⁾, 木内茂巳²⁾,
鈴木ゆかり¹⁾, 薄田那津子¹⁾

¹⁾ 香川県立医療短期大学臨床検査学科

²⁾ 香川県予防医学協会 病理細胞診センター

Morphometry and Immunocytochemical Characteristics in Fluid Cytology

Eiichiro Hirakawa^{1)*}, Yasuko Yamamoto¹⁾, Yasuhiro Morita¹⁾,
Chigusa Fujimoto¹⁾, Masayuki Nakano²⁾, Tadao Shiooka²⁾, Makoto Shiraishi²⁾,
Shigemi Kinouchi²⁾, Yukari Suzuki¹⁾ and Natuko Susukida¹⁾

¹⁾ *Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences*

²⁾ *Preventive Medicine Institutes of Kagawa, Diagnostic Pathology and Cytology Institute*

Abstract

Cytologic study on body fluid is very important to diagnose whether it caused by neoplasm or not. The pathological and clinical diagnoses are often difficult in cases with reactive mesothelium in inflammatory disease. We assessed the nuclear morphometry in fluid cytology in 9 cases with adenocarcinoma and in 11 cases with reactive mesothelium. Immunocytochemical study for p53 protein and Ki-67 was also performed in 8 cases with adenocarcinoma and 9 cases with reactive mesothelium. Circular rate and largest to smallest diameter ratio were significantly higher in cases with reactive mesothelium than adenocarcinoma cases. Immunocytochemically, the cases of adenocarcinoma showed stronger reactivity to p53 protein and Ki-67 than those of reactive mesothelium. We concluded that these markers were useful in diagnosis of adenocarcinoma and reactive mesothelium.

Key Words : 体腔液細胞診 (body fluid cytology),
Ki-67,
p53蛋白 (p53 protein),
核形態計測 (morphometry)

*連絡先: 〒761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原281-1 香川県立医療短期大学臨床検査学科

*Corresponding address: Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences,
281-1 Hara, Mure-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0123, Japan

はじめに

体腔は臓器を容れる閉鎖腔で、胸腔、腹腔、心膜腔がある。これらの体腔表面を覆う細胞が中皮細胞である。中皮細胞は単層の扁平な細胞であるが、体腔液貯留時には容易に立方状に形を変える。胸腹水の細胞診は貯留した体腔液に対して、その原因が癌によるものか、あるいは炎症などの他の原因によるものかを判定するためになされるが、その際中皮細胞は著しくその形態を変え腺癌との鑑別が困難な反応性中皮となることがある。そのため体腔液細胞診において、反応性中皮は他臓器からの悪性腫瘍転移、特に腺癌の転移との鑑別が重要になってくる。これまで多くの研究により、腺癌、中皮細胞を鑑別するための検討が行われてきた¹⁾。現在では有用ないくつかの免疫組織化学的マーカーが知られるようになり²⁾、実際の組織診、細胞診に応用されているがp53蛋白やKi-67を用いた細胞診での報告は少ない。

今回われわれは腺癌および反応性中皮の細胞診標本を用いてその鑑別を目的として核形態計測とp53蛋白、Ki-67の免疫細胞化学的検討を行った。

対象と方法

対象は2001年3月から9月までに香川県予防医学協会より得られた胸腹水細胞診で、class 5の腺癌と診断された9例とclass 1またはclass 2で反応性中皮と診断された11例を用いた。悪性症例は、臨床的あるいは病理組織学的に悪性であることを確認

したものをを用いた。胸腹水細胞診の採取部位の内訳は腺癌と診断された9例中5例が胸水からで、4例が腹水からであった。また、反応性中皮の11例中8例は胸水、3例は腹水で、各症例における性別比は、腺癌で男性2人女性7人、反応性中皮では男性8人女性3人であった。腺癌、反応性中皮症例の各パニコロウ染色標本より100個以上の腺癌または反応性中皮を抽出し、画像解析装置(オリンパス、ウィンループ)にて核の形態計測を行った。計測は面積、周囲長、円形度、絶対最大長、楕円長軸長、楕円短軸長、楕円長短比(Asspect ratio)の7項目について行い、腺癌、反応性中皮の各平均値と標準偏差を出し、t検定を行った。免疫細胞化学的検索は塗抹した細胞診材料をメタノール固定後、抗Ki-67抗体、抗p53抗体(DAKO)を用い、酵素抗体法(SAB法)により染色を行った。Ki-67とp53陽性率の判定は腺癌8例と反応性中皮9例について行い、それぞれの細胞を100個計測し、そのうち陽性細胞の占める割合を陽性率として用いた。

結 果

1. 核の形態計測

腺癌と反応性中皮の平均値は、それぞれ面積が42.95 μm^2 と37.77 μm^2 、周囲長は23.87 μm と22.14 μm であった(Fig. 1)。絶対最大長は8.70 μm と8.03 μm 、楕円長軸長は8.66 μm と7.97 μm 、楕円短軸長は5.97 μm と5.80 μm であった(Fig. 2)。円形度は0.86と0.89、楕円長短比は0.70と0.73であった(Fig. 3)。腺癌と反応性中皮との間に面

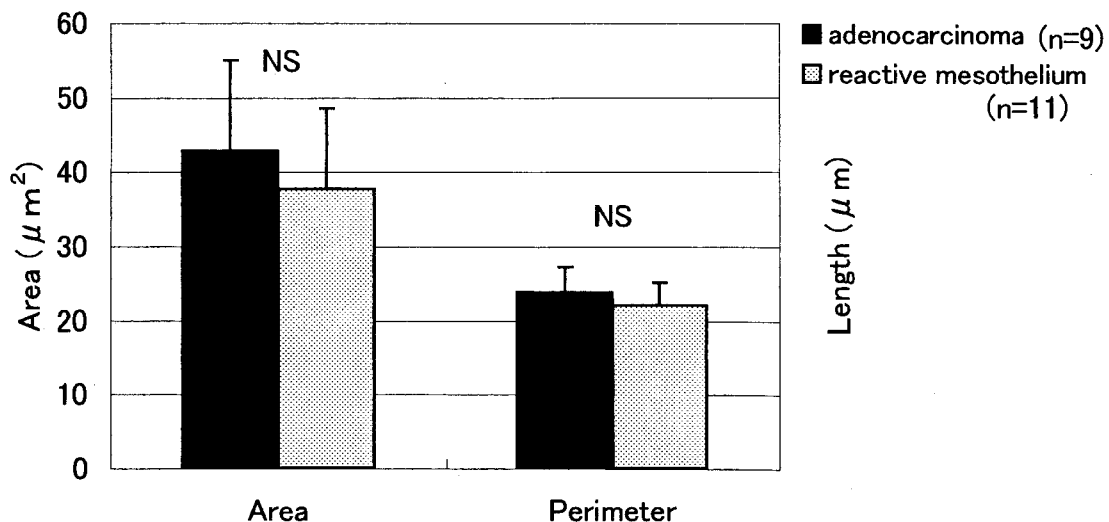


Fig. 1 Area and length of perimeter.

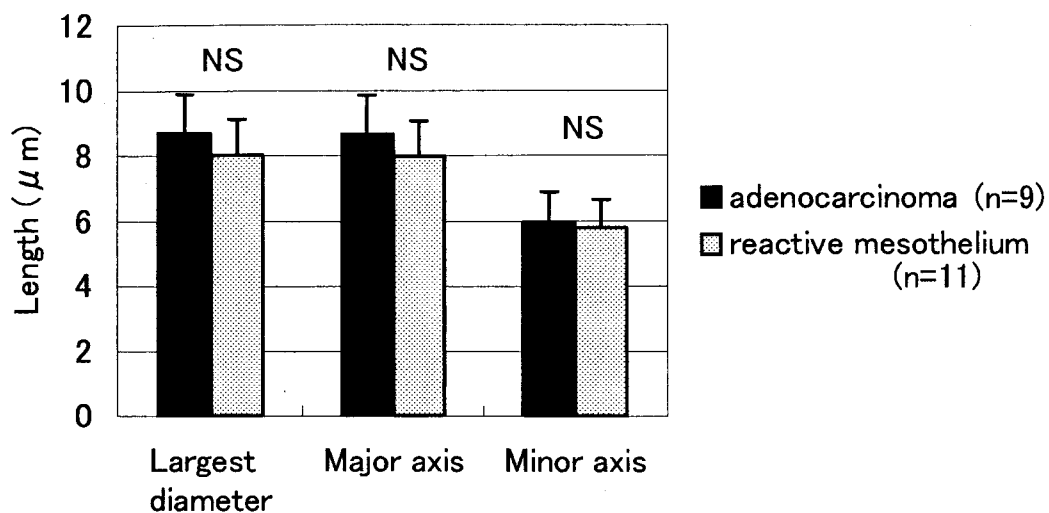


Fig. 2 Length of largest diameter, major axis and minor axis.

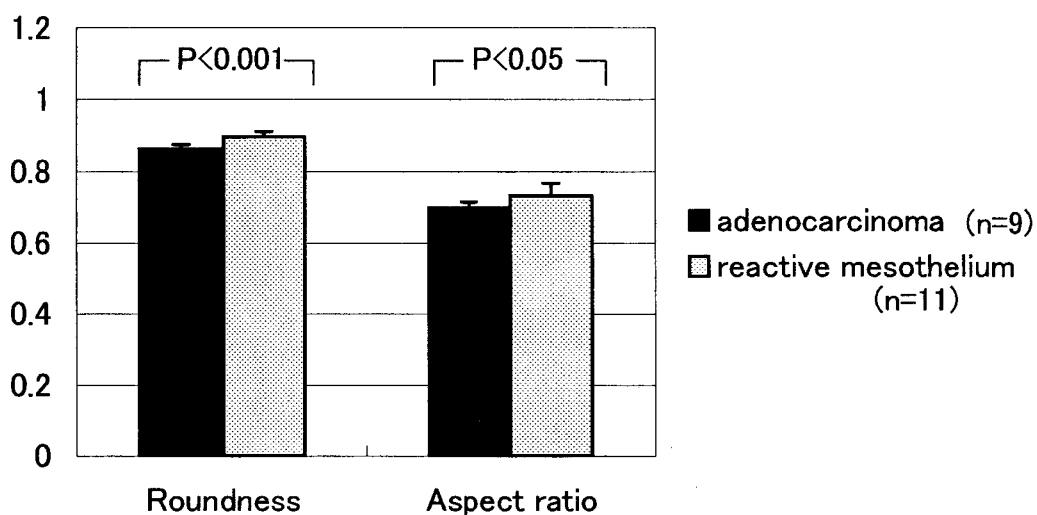


Fig. 3 Roundness and aspect ratio.

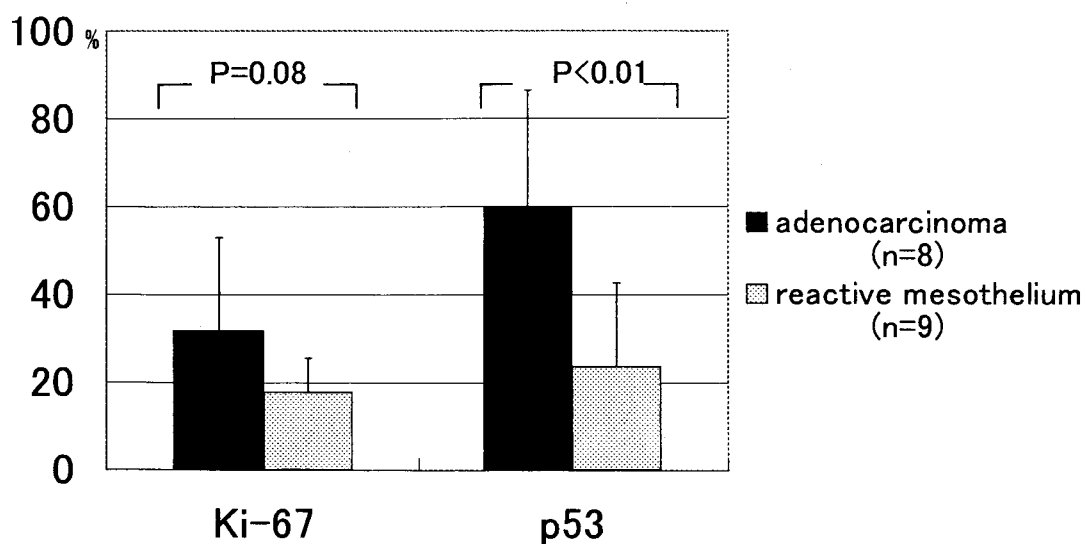


Fig. 4 Positive index of Ki-67 and p53.

積，周囲長，絶対最大長，楕円長軸長，楕円短軸長では有意差は認められなかったが，円形度 ($P=0.0002$)，楕円長短比 ($P=0.017$) において有意な差が認められた。

2. 免疫細胞化学的検討

Ki-67の腺癌症例と反応性中皮症例の positive index はそれぞれ $31.8 \pm 21.1\%$ ， $17.8 \pm 7.7\%$ であった ($P=0.08$)。また，p53の positive index は腺癌症例では $59.5 \pm 26.8\%$ ，反応性中皮症例では $23.6 \pm 19.5\%$ であり，明らかに腺癌に陽性率が高かった ($P<0.01$) (Fig. 4)。

考 察

今回われわれは胸腹水の細胞診材料を用いて，核形態計測と p53，Ki-67の免疫細胞化学的検討を行った。その結果，面積，周囲長，絶対最大長，楕円長軸長，楕円短軸長では腺癌と反応性中皮に有意な差はみられなかった。しかし形状を示すパラメーターの一つである核の円形度，楕円長短比では両者の間に有意差が認められた。円形度は1.0に近づくほど円に近い形となるが，腺癌では円形度は0.863，反応性中皮では0.894であり，反応性中皮の方がより円に近いということがわかる。楕円長短比では腺癌が0.70，反応性中皮は0.73であり，円形度の場合と同様に腺癌は楕円形に近い形状であり，反応性中皮は腺癌と比較すると円に近い形状を有していた。一般に腺上皮の核は楕円をなしているが，腺癌の核が反応性中皮に比して楕円形であるのは，その組織起源である腺上皮の核が楕円形であり，その性格を保持しているためと考えられる。また，中皮細胞は単層扁平上皮であり，その核は平面的にみた場合円形に近い形状をしている。従って中皮細胞は炎症などにより反応性中皮となり核が大型になり異型を生じてきても円形を保っていると考えられる。

細胞診断や組織診断で良悪の判定には核異型の程度が重要な役割を担うが，この異型という意味の中には核の大きさ，大小不同，核の多形性，核クロマチンや核小体の性状が含まれている。形態計測で核の大きさや大小不同を示す面積や長さには有意差がみられなかったことは意外な結果であり，裏を返せばそれだけ核の大きさや大小不同で腺癌と反応性中皮を鑑別することは困難であると推察できる。腺癌と反応性中皮を鑑別する場合，細胞質の性状や核の位置，クロマチンの性状に注目することは当然である

が，今回の結果から，核の形状に関してはその大きさよりもその円形度に注目した方が鑑別に有用であると考えられた。

腺癌と悪性中皮腫の鑑別に免疫組織化学を用いた報告^{3,4)}があるが，腺癌と反応性中皮について癌抑制遺伝子蛋白である p53蛋白と増殖期の細胞マーカーである Ki-67について検討した報告は少ない。

Ki-67の positive index は，腺癌で31.8%，反応性中皮で17.8%であり，p53蛋白は腺癌で59.5%，反応性中皮で23.6%であった。p53蛋白では腺癌と反応性中皮の間に有意差が認められた ($P<0.01$) が，Ki-67では有意差はみられなかった ($P=0.08$)。また，腺癌と反応性中皮のいずれの症例も Ki-67より p53蛋白の陽性率が高い傾向が認められた。癌化した細胞は p53遺伝子が損傷を受け，癌抑制に作用しない変異型 p53蛋白が産生される。変異型 p53蛋白は分解時間が著しく延長するので，核内に変異 p53蛋白が蓄積されるためである⁵⁾。

一方 Ki-67は増殖期の細胞に発現が認められるマーカーである。腺癌と反応性に増殖している反応性中皮細胞はいずれも増殖期細胞が多いと考えられるので有意差は認められなかったと推察できる。

以上の結果より，腺癌と反応性中皮の鑑別に円形度，楕円長短比を測定することは非常に有用であると考えられた。従来から腺癌と中皮細胞の形態学的な鑑別点としては，細胞質の性状が強調されているが核の円形度に注目した論文はみられない。腺癌と反応性中皮の核形態計測を行い，円形度，楕円長短比をその鑑別に導入したのは本論文がはじめてであり，それらの特徴はパパニコロウ染色標本を用いて細胞所見をとる際にもあらためて注意を払い観察すべき点であると考えられた。免疫組織化学では腺癌と中皮細胞の鑑別に用いられる有用なマーカーとして Calretinin，HBME-1，CEA などがあげられる²⁾。Calretinin，HBME-1 は中皮細胞において陽性率が高いが，一方腺癌においても高い陽性率を得る場合がある^{2,3)}。CEA は中皮細胞に比べ腺癌において陽性率が高いが，約35%の症例で腺癌においても陰性となる^{2,3)}。従ってこれらを単独で使用するより，Ki-67，p53蛋白の陽性率をともに用いることが腺癌と反応性中皮を鑑別するために有効な手段であり，特に p53蛋白は補助的な診断法として応用可能であると考えられた。

文 献

- 1) 加藤智行, 白崎俊典, 有吉啓子, 石堂統, 伊藤以知郎, 橋詰薫, 畑中豊(2001)免疫細胞化学を用いた体腔液出現細胞の鑑別. 日本臨床細胞学会雑誌, 40(Suppl.1): 216.
- 2) 伊藤仁, 宮嶋葉子, 長村義之(2000)免疫組織化学と in situ hybridization のすべて. 細胞診への応用, 体腔液. 病理と臨床, 臨時増刊号: 208-211.
- 3) 岡本聡, 今野良, 高野忠夫, 他(1998): 腹水(腹腔洗浄)細胞診における悪性卵巣腫瘍細胞と中皮細胞の鑑別法としての免疫組織化学. 日本臨床細胞学会雑誌, 37(4): 389-393.
- 4) 今枝義博, 堀部良宗, 今津守隆, 堀口高彦, 立川壮一, 村上正基, 笠原正男(2001)悪性胸膜中皮腫の腫瘍マーカーおよび免疫組織化学的検討. 日本胸部臨床, 60(4): 383-387.
- 5) 杉山武敏, 高橋玲(1996)癌抑制遺伝子 RB と P53, “分子病理学”, 文光堂, 東京, p. 367-368.

受付日 2002年1月16日