

体腔液中の胃癌細胞における epithelial membrane antigen , carcinoembryonic antigen および epithelial-related antigen の発現とその細胞面積の関係

久留米大学医療センター 臨床検査室¹⁾ 久留米大学病院 病理部²⁾
近藤 恵子¹⁾ 山口 倫¹⁾ 河原 明彦²⁾ 鹿毛 政義²⁾

はじめに

腹腔内洗浄細胞診における陽性判定は、腹膜播種を示唆する病理学的所見となるため、その細胞判定は重要である。腹腔内洗浄細胞診が陽性と判定された胃癌患者の5年生存率は、約20%以下と極めて低く予後不良な因子とされている¹⁾。Epithelial membrane antigen (EMA; E29), carcinoembryonic antigen (CEA; polyclonal) や epithelial-related antigen (ERA; MOC-31) のような腫瘍マーカーは、体腔液中にみられる正常中皮細胞に発現がみられないため、腺癌細胞や悪性中皮腫などの検証に最も多く使われている^{2)・6)}。腹水細胞診では低分化型胃癌あるいは印環細胞癌のような小型の癌細胞の出現に留意しながら細胞観察を行わなければならない (Photo 1)。しかしながら、小型癌細胞の出現数は症例によりさまざまであり、出現数が少ない場合は、しばしば細胞判定に苦慮することがある。そのため、当院では診断の補助として、細胞異型あるいは出現数に乏しい癌細胞の判定に抗EMA (E29) 抗体を用いた免疫細胞化学を行い、細胞形態と合わせて総合判定している。その際、我々は小型の胃癌細胞がEMA (E29) 抗原を有している事に注目した。

今回我々は、小型胃癌細胞がEMA (E29) と同様にCEA やERA (MOC-31) の抗原性を有しているかどうか、また癌細胞面積とこれらの抗原性に関係があるかどうか検討を行った。

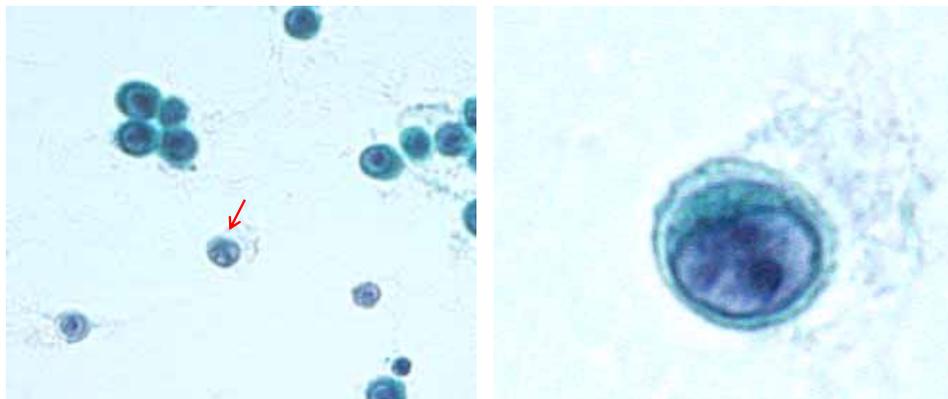


Photo 1

Papanicolaou stain, ×400

Papanicolaou stain, ×1000

胃癌細胞は孤立散在性に出現し、N/C 比の増加と著名な核小体を有する。

対象

腹水細胞診において癌細胞陽性と判定した胃癌患者8例を対象とした。検体採取法は3例が術中洗浄法で、5例は腹腔穿刺吸引法であった。対照として非癌患者3例の腹水細胞診症例を用いた。その内訳は肝硬変2例、心不全1例で、全て腹腔穿刺吸引法であった。

方法

1. 細胞転写法

すべての腹水細胞診標本を用いて細胞転写法を行い，免疫染色が可能な標本を少なくとも5枚作製した⁸⁾。

2. 免疫細胞化学

細胞転写標本を用いて胃癌8症例に対しては抗EMA(E29)抗CEAおよび抗ERA(MOC-31)抗体を(Photo 2)，非癌3症例に対しては抗mesothelial cell(HBME-1)と抗calretinin(DAK-Calret 1)抗体を用いて免疫細胞化学を施行した。ERA(MOC-31)およびcalretinin(DAK-Calret 1)に関しては，クエン酸緩衝液(pH6.0)を用いて，マイクロウェーブ99分賦活処理を行った。

3. 細胞面積解析法

- a) 胃癌8症例において，EMA(E29)，CEAおよびERA(MOC-31)が陽性となった癌細胞をデジタルカメラを用いて，比較的小さい癌細胞からそれぞれ約50細胞のデジタル画像を抽出した。但し，強陽性細胞のみを抽出し，弱陽性細胞は抽出しなかった。対照とした非癌症例はmesothelial cell(HBME-1)あるいはcalretinin(DAK-Calret 1)で陽性を示した中皮細胞を3症例で約50細胞のデジタル画像を抽出した。また，約30細胞のリンパ球のデジタル画像も抽出した。
- b) 抽出したデジタル画像は，画像解析ソフト(WinROOF)を用いてすべての癌細胞，中皮細胞およびリンパ球の細胞面積を計測した。
- c) 癌細胞約50細胞の計測結果から，細胞面積の小さい30細胞を決定し，症例間で比較を行った。中皮細胞も同様に，細胞面積の小さい30細胞を決定した。

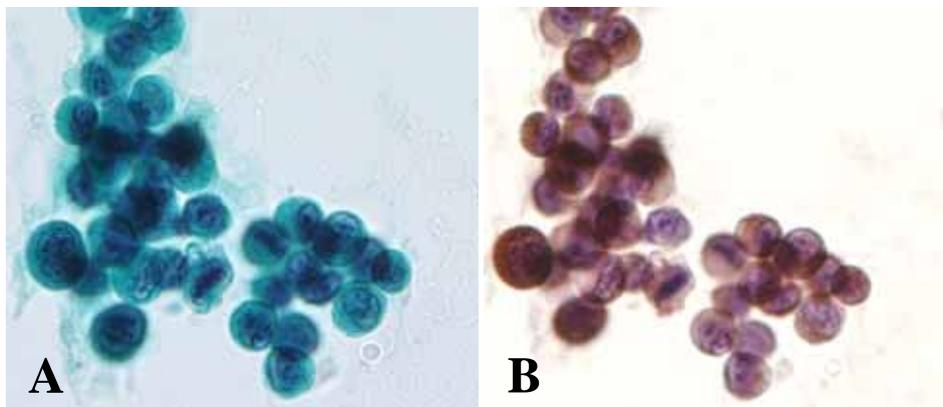


Photo 2

A: Papanicolaou stain, ×400

B: Immunocytochemistry, EMA ×400

胃癌細胞は，細胞の大小不同を示し集塊で出現している(A)。
細胞転写標本を用いた免疫細胞化学，胃癌細胞はEMA(E29)が陽性を示した(B)。

結果

1. EMA (E29), CEA, ERA (MOC-31), mesothelial cell (HBME-1) および calretinin (DAK-Calret 1) の発現

胃癌細胞は EMA (E29), CEA または ERA (MOC-31) が陽性であったが, 同一標本において陰性の癌細胞も少数みられた (Photo 3). 中皮細胞は mesothelial cell (HBME-1) と calretinin (DAK-Calret 1) が強陽性を示した. 症例によって中皮細胞は EMA (E29) の弱陽性、ERA (MOC-31) の非特異反応を認める (Photo 4). また, CEA は好中球にしばしば非特異反応を認めた.

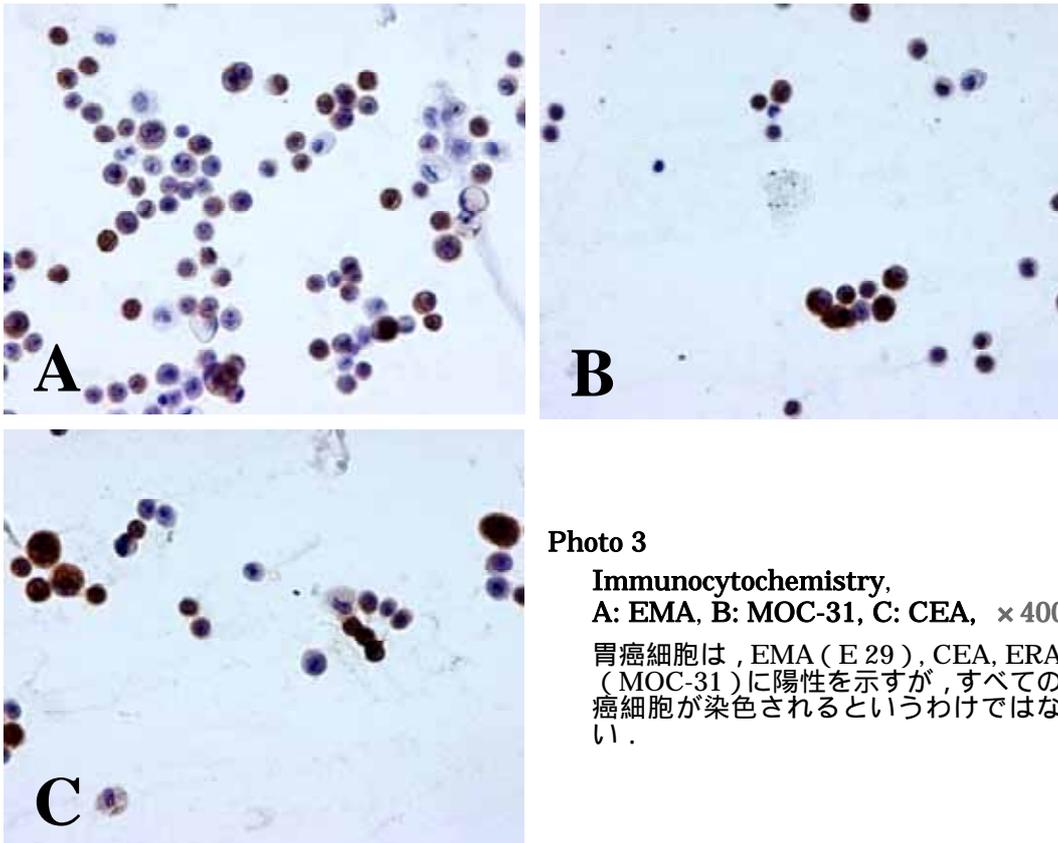


Photo 3

Immunocytochemistry,

A: EMA, B: MOC-31, C: CEA, ×400

胃癌細胞は, EMA (E 29), CEA, ERA (MOC-31) に陽性を示すが, すべての癌細胞が染色されるというわけではない.

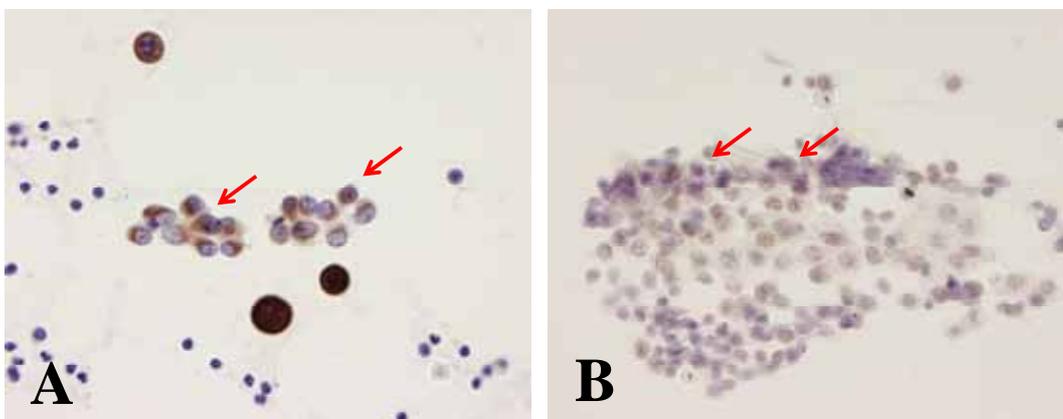


Photo 4

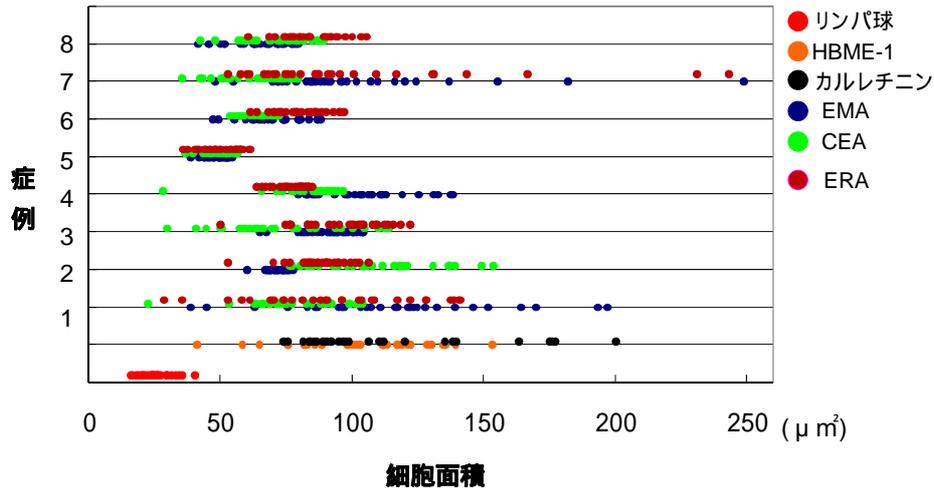
Immunocytochemistry, A: EMA, B: MOC-31, ×400

中皮細胞はしばしば EMA (E 29) の弱陽性 (A), ERA (MOC-31) の非特異的反應 (B) を認めることがある.

2. EMA (E29), CEA および ERA (MOC-31) の発現と細胞面積の比較

Figure 1 に各症例における EMA (E29), CEA および ERA (MOC-31) の発現と細胞面積の結果を示す。EMA (E29), CEA あるいは ERA (MOC-31) が陽性の癌細胞の平均細胞面積は、それぞれ $83.3 \pm 29.8 \mu\text{m}^2$, $73.9 \pm 22.0 \mu\text{m}^2$ および $83.8 \pm 25.9 \mu\text{m}^2$ であった。症例間で EMA (E29), CEA および ERA (MOC-31) の腫瘍マーカーが陽性となった癌細胞の細胞面積を比較した結果、最も大小不同を呈していたのは症例 7 ($87.6 \pm 39.5 \mu\text{m}^2$) であり、最も大小不同が乏しかったのは症例 5 ($49.8 \pm 5.8 \mu\text{m}^2$) であった。対照としたリンパ球の平均細胞面積は $25.8 \pm 6.0 \mu\text{m}^2$ であり、mesothelial cell (HBME-1) あるいは calretinin (DAK-Calret 1) が陽性となった中皮細胞の平均細胞面積はそれぞれ $104.7 \pm 25.8 \mu\text{m}^2$, $112.3 \pm 35.1 \mu\text{m}^2$ であった。

Figure 1



3. 発現細胞数と細胞面積の関係

Figure 2 に陽性細胞数と細胞面積の関係を腫瘍マーカー別に示す。細胞面積を約 $15 \mu\text{m}^2$ 間隔で EMA (E29), CEA あるいは ERA (MOC-31) が陽性を示した癌細胞数を比較した場合、 $60.0 \sim 74.9 \mu\text{m}^2$ の細胞面積を有する胃癌細胞は、EMA (E29) と CEA が陽性となった癌細胞が最も多かったのに対し、 $75.0 \sim 89.9 \mu\text{m}^2$ の胃癌細胞は、ERA (MOC-31) が陽性となった癌細胞が最も多かった。リンパ球平均細胞面積の 2 倍以下 ($51.6 \mu\text{m}^2$) の癌細胞は ERA (MOC-31) よりも EMA (E29) と CEA の陽性率が高かった (Table 1)。

Figure 2

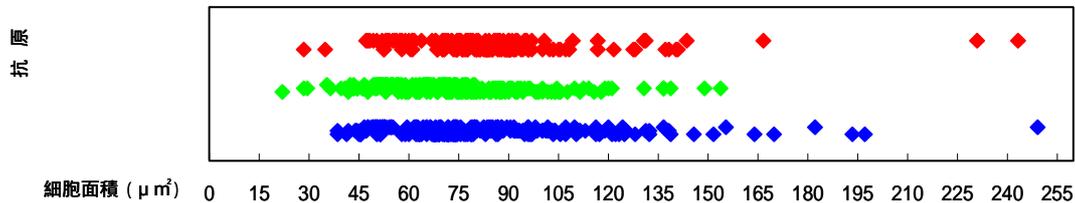
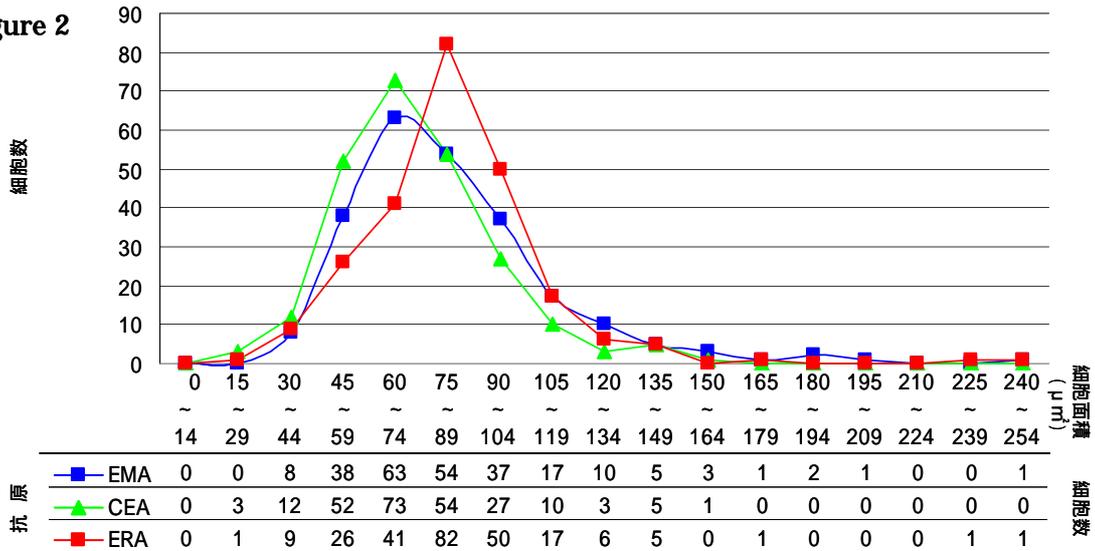


Table 1 腫瘍マーカーと中皮マーカーにおける小型胃癌細胞の発現頻度

	腫瘍マーカー			中皮マーカー	
	EMA	CEA	MOC-31	HBME-1	Calretinin
リンパ球細胞面積の	12.9%	12.9%	7.5%	3.3%	0%
2倍以下(51.6 μm ²)	(31/240)	(31/240)	(18/240)	(1/30)	(0/30)

考察

体腔液中に播種した癌細胞の免疫細胞化学的検討は比較的多く、その大半が中皮細胞を含めた悪性中皮腫と腺癌との鑑別、あるいは原発巣推定に関する検討である^{3)・7)}。我々が調べた限りでは、今回検討した小型胃癌細胞における発現数とその細胞面積の関係についての報告はない。腹膜播種した低分化型胃癌細胞において、EMA (E29)、CEAおよびERA (MOC-31) はほとんどの症例で陽性を示したが、その陽性率は症例間で異なっていた。小型胃癌細胞はmesothelial cell (HBME-1) あるいはcalretinin (DAK-Calret 1) 陽性の中皮細胞より小さく、EMA (E29) とCEAが陽性を示す傾向にあった。

本検討では細胞転写の必要があるため、あえて癌細胞数が豊富で形態的にも癌と鑑別できた症例を用いた。細胞診断の補助として免疫細胞化学は有用であるが、術中迅速を含めた体腔液細胞診は標本枚数に限りがあるため、標本中の細胞を注意深く観察し、鑑別すべき疾患に応じた適切な抗体を選択する必要がある。少数しか癌細胞がみられない体腔液症例において、通常の形態的診断(パパニコロウ染色)に難渋する小型胃癌細胞(リンパ球2倍程度)を検出する際は、抗EMA (E29) あるいは抗CEA抗体を用いる事が有効であると思われる。また、免疫細胞化学の留意点として、中皮細胞のEMA (E29) 弱陽性やERA (MOC31) の非特異反応、および炎症細胞におけるCEAの非特異反応がみられるため、判定の際は常に細胞形態を考慮する必要があると思われる。

まとめ

低分化型胃癌細胞の判定は、パパニコロウ染色のみではしばしば困難であるため、免疫細胞化学を併用することにより、診断率の向上につながると思われる。低分化型胃癌細胞の中でも特に小型癌細胞の証明には抗CEA または抗EMA (E29) 抗体のいずれかを選択するべきである。

謝辞 本検討について御助言頂きました、ふじおか病院 中島 裕先生、久留米大学病院病理部 山口知彦技師、安倍秀幸技師、吉田友子技師、多比良朋希技師、横山俊朗技師に深謝いたします。

文献

- 1) 広岡保明, 大西弘美, 大上佳三, 上田毅, 鈴木一則, 山根祥晃, 貝原信明, 塩田撰成, 西江浩, 大谷眞二. 胃癌の術中細胞診陽性例における癌細胞数の検討. 日本臨床細胞学会誌 2003; 42: 440-443
- 2) 落合弘美, 桜井友子, 宇佐見公一, 小林由美子, 泉田佳緒理, 佐藤由美, 小池敦, 太田玉紀, 本間慶一, 根本慶一. 胃癌における腹腔洗浄細胞診の意義. 日本臨床細胞学会誌 2003; 42: 444-452
- 3) 西山みどり, 山崎志寿子, 高橋剛, 吉田康雄, 岸田由紀子, 薬丸一洋, 高山昇二郎. 悪性中皮腫と肺腺癌の鑑別について - 中皮腫と鑑別が問題になった腺癌の比較検討 -. 日本臨床細胞学会誌 1996; 35: 409-418
- 4) 杉島節夫, 安倍秀幸, 山口知彦, 河原明彦, 横山俊朗, 吉田友子, 鹿毛政義, 渡辺次郎. 悪性中皮腫に対するHBME-1抗体とEMA抗体を用いた免疫細胞化学の有用性. 日本臨床細胞学会誌 2001; 40: 450-456
- 5) 岡本聡, 今野良, 高野忠夫, 我妻理重, 永瀬智, 吉田祐司, 五十嵐司, 佐藤信二, 矢嶋聡. 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. 日本臨床細胞学会誌 1998; 37: 389-393
- 6) 森永謙二. 悪性胸膜中皮腫の診断精度の向上及び治療法に関する研究. 厚生労働省 がん研究助成金による研究報告書 平成15年度
- 7) 佐久間暢夫, 亀井敏昭, 渋谷秀美, 岡村宏, 権藤俊一, 石原得博. 胸水中に出現する悪性中皮細胞と肺腺癌細胞の鑑別 - 画像解析装置を用いて -. 日本臨床細胞学会誌 1996; 35: 93-98
- 8) 伊藤仁, 加戸伸明, 宮嶋葉子. 免疫組織化学 - 細胞診への応用の実際 -. ニチレイバイオサイレンス 免疫染色玉手箱 2008