

体腔液細胞診材料を用いた セルブロック法による免疫染色の有用性

公立昭和病院検査科 濱川真治, 柏崎好美, 森 一磨
病理診断科 清水誠一郎

【はじめに】

画像診断や組織生検に先立って採取される体腔液細胞診の目的は、悪性細胞の検出のみならず、組織型推定や原発巣推定を担うようになってきた。その背景には、化学療法に感受性の高い卵巣漿液性腺癌や神経内分泌癌など、あるいは癌抗体療法の研究が盛んに行われている乳癌や肺癌、大腸癌、悪性リンパ腫等があり、適切な治療法により治療効果が期待できる症例を見落とさないことが挙げられる。また、中皮腫においては、「石綿による健康被害の救済に関する法律」に基づく指定疾病の認定に係る医学的判定結果の留意事項のなかで、パパニコロウ染色による形態学的特徴および免疫染色の結果について、詳細に記載することと書かれている。そこで今回、簡便なセルブロック作製法を紹介し、免疫染色の有用性について実例を挙げて報告する。

【細胞診塗抹材料による免疫染色】

細胞診の利点は、スライドガラスに塗抹された細胞をくまなく広く拾い上げることができる点である。その拾い上げた細胞をターゲットとして、カバーガラスをはずした後に、同一標本上で免疫染色を行うことも可能である。また細胞転写法¹⁾は、パパニコロウ染色標本などに出現している細胞を封入剤によって複数の標本に分割分離し、腫瘍マーカーやリンパ球表面マーカー、細胞増殖因子や癌抑制遺伝子産物、細胞骨格フィラメントなどの抗原検索が可能となる。しかし、細胞診断に用いた標本を取り崩さなければならない欠点もある。

【セルブロック法による免疫染色の利点】

一方で、細胞塗抹標本作製後に残存する細胞を様々な方法で収集し、組織診断と同様にホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックを作製するセルブロック法がある。セルブロック法の利点は、塗抹細胞標本では細胞集塊の構築が十分把握できない場合などに、包埋・薄切といった組織学的手法にて細胞薄切連続切片を作製し、細胞組織切片像として観察することが可能となる。また、包埋された細胞は半永久的に保存可能であり、今後の癌治療方針決定にも貢献できる材料となりうる。細胞を収集する手段としては大きく分けて遠心分離細胞収集法と、細胞凝固・固化法の2通りがある。様々なセルブロック作製法を表1に紹介する。

表1 各種セルブロック作製法

A. 遠心分離細胞収集法	B. 細胞凝固・固化法
遠心管法 ²⁾	寒天法 ⁹⁾
クロロホルム重層法 ³⁾	セルロース法 ¹⁰⁾
ナイロンメッシュ法 ⁴⁾	アルギン酸ナトリウム法 ¹¹⁾
コロジオンバック法 ^{5)~7)}	グルコマンナン法 ¹²⁾
クライオバイアル法 ⁸⁾	

【クライオバイアルによるセルブロック作製法】

クライオバイアルとは、一次抗体などを凍結保存しておく 2 ml 容量の容器である (図 1)。遠心分離法にて細胞を収集し、上清を排出した後にホルマリンを重層し、24 時間程度固定する。ホルマリンを排出後、クライオバイアルを切断し、そのまま脱水、パラフィン浸透工程に進む。パラフィン浸透後、細胞塊はクライオバイアル底部から容易に剥離でき、包埋が可能となる。一連の操作をフローチャートに示す (表 2)。

表 2 クライオバイアルを用いたセルブロック作製手順

- ① 細胞診塗抹標本作製後に残存する細胞沈渣を用いる。
- ② クライオバイアル (TOHO 社 T311-2 2ml, 図 1) にキャピラリーにて細胞沈渣を 0.2ml 程度吸引回収 (細胞沈渣が多い場合は固定不良を防ぐため、複数のクライオバイアルに分注) する。
- ③ 蓋をして 3000rpm 3 分間の遠心分離操作を行う。
- ④ 上清部をスポイドで排出後、20%中性緩衝ホルマリンを静かに重層 (細胞沈渣を舞い上げないように) する。
- ⑤ 蓋をして約 24 時間室温で静置固定した後、ホルマリンをスポイドで排出し、カッターナイフやハサミでクライオバイアルの 0.5ml 目盛り部を目安として切断 (図 2) する。
- ⑥ ホルマリン固定後の沈渣は、半球状にほぼ硬化している。切断したクライオバイアルごとサンプルメッシュパック (栄研器材) に入れ、ホッチキスで封をする。
- ⑦ 型どおりアルコール脱水・パラフィン浸透操作に移行する。切断したクライオバイアルの切断口は、薬液の浸透を妨げないように横向きに設置する。
- ⑧ パラフィン浸透後の細胞塊は、半球状を呈し、ピンセットにより比較的簡単にクライオバイアル底部から離脱する。
- ⑨ 細胞塊はバッフィコート部分を包埋皿の底面に軽く押しつける様にして包埋する (図 3)。パラフィン包埋ブロック作製後は、臓器組織と同様に連続切片を作製することが可能となる (図 4)。

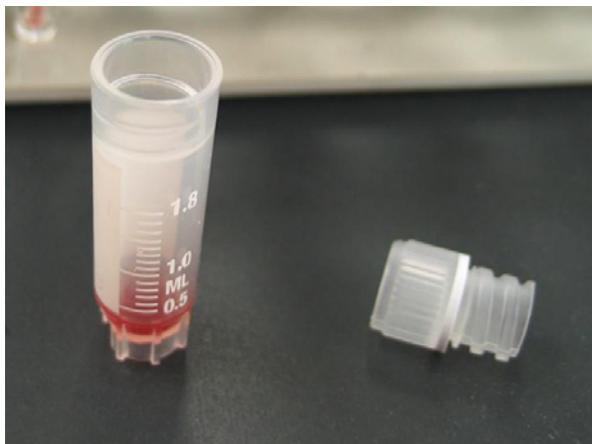


図 1 クライオバイアル (TOHO T311-2)
一次抗体などを凍結保存する容器である

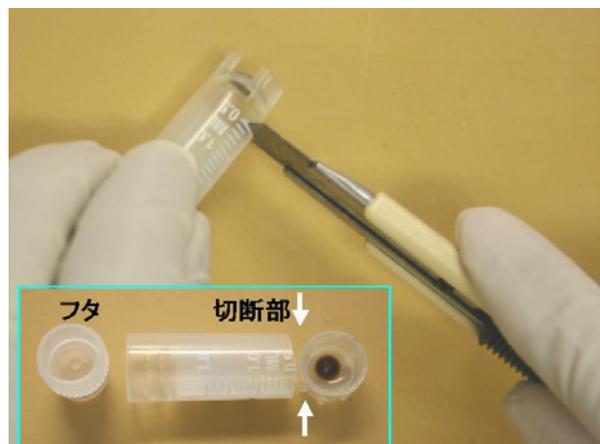


図 2 クライオバイアルの切断
クライオバイアルをカッターナイフなどで切断する

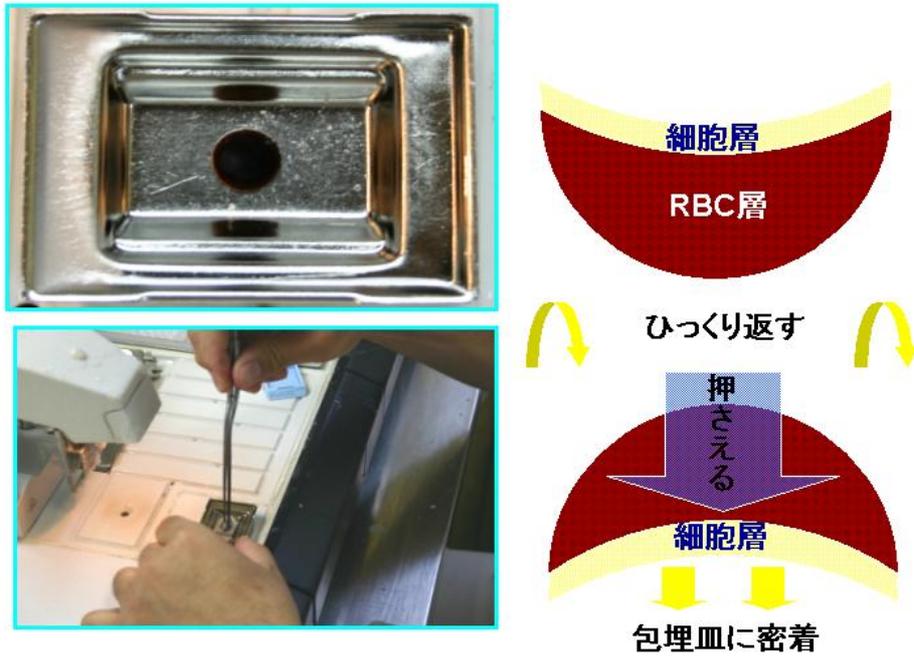


図3 細胞塊の包埋法

細胞塊の細胞層を包埋皿の底部に軽く押しつけるようにして包埋する

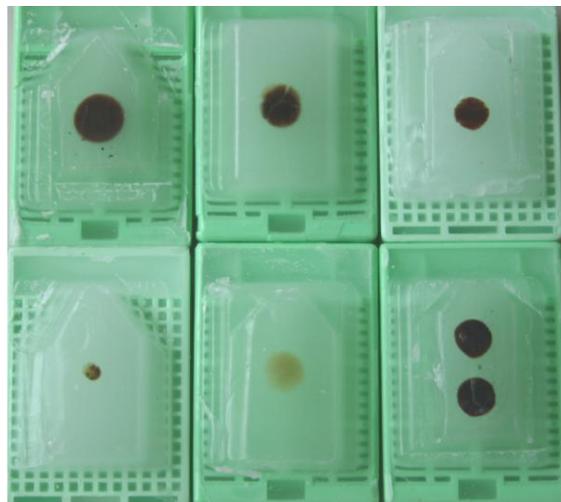


図4 パラフィンブロック

臓器組織と同様に連続切片が可能となる

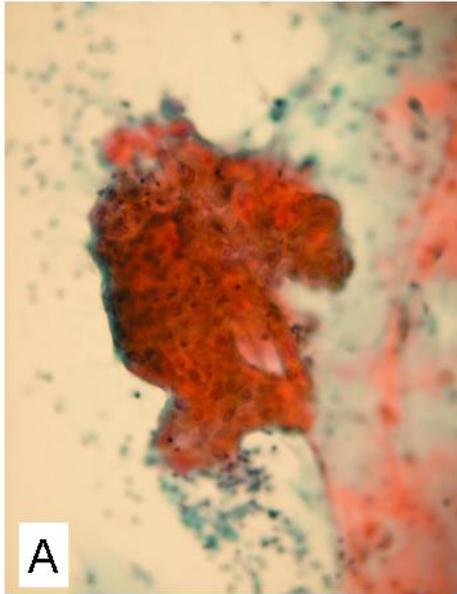
【まとめ】

体腔液細胞診材料におけるクライオバイアルを用いたセルブロック法による免疫染色の有用性を紹介した。

セルブロック法による免疫染色は、良悪の判定や原発巣推定に有用な方法である。

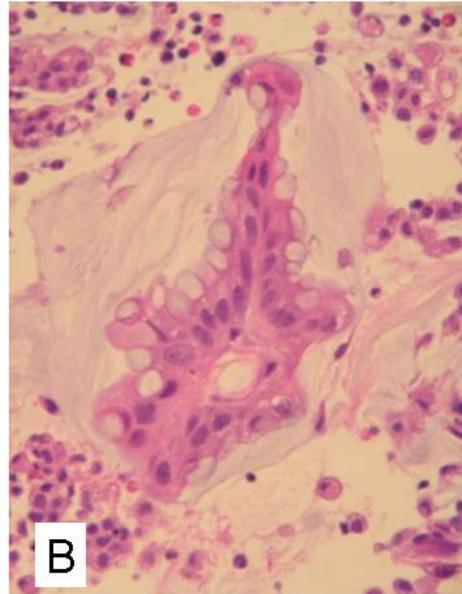
【クライオバイアルを用いたセルブロック法による免疫染色の症例提示】

症例 1: 腹水 臨床診断: 骨盤内腫瘍
 病理診断: 下部消化管癌疑い



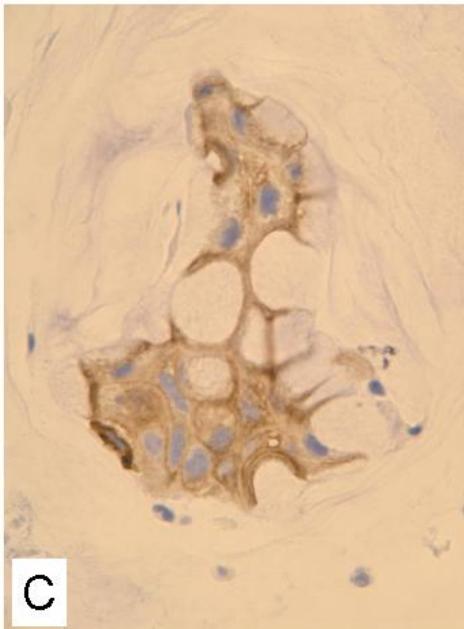
A

A: Papanicolaou 染色
 粘液様物質を背景に異型細胞集塊を認める



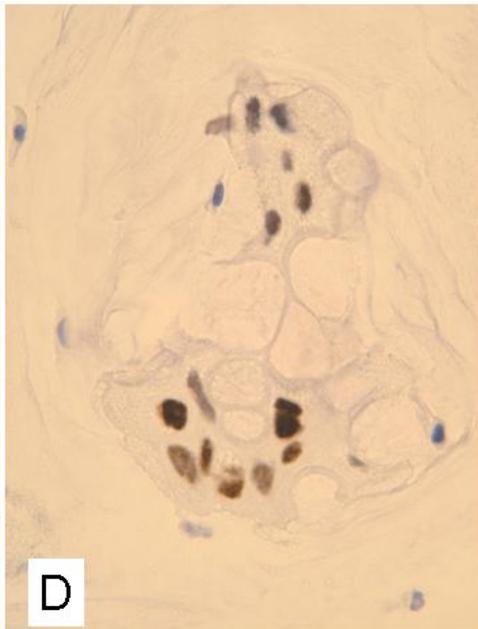
B

B: HE 染色
 粘液様物質を背景に乳頭状の集塊を認める



C

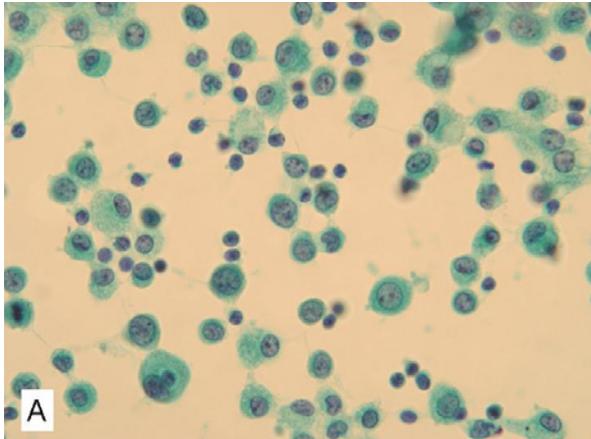
C: 抗 cytokeratin 20 抗体
 (clone:Ks20.8, ニチレイバイオサイエンス)
 細胞質が陽性となる



D

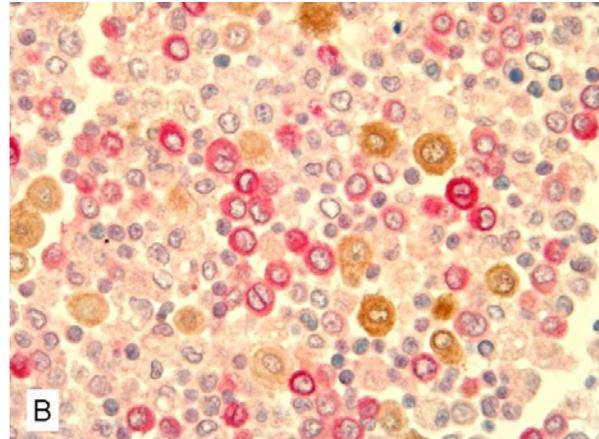
D: 抗 CDX-2 抗体
 (clone:CDX-2-88)
 核が陽性となり、下部消化管癌や卵巣癌が疑われる所見である

症例 2: 胸水 既往歴: 皮膚悪性黒色腫
 病理診断: 悪性黒色腫



A: Papanicolaou 染色

背景にはリンパ球や組織球を認め、その中に N/C 比の増大した異型細胞を認める



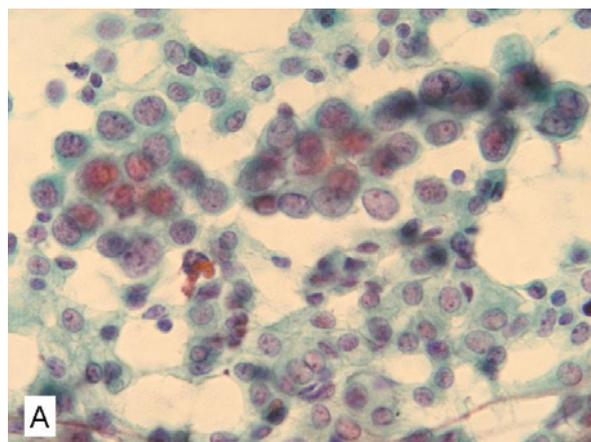
B: 抗 Melan-A 抗体と 抗 calretinin 抗体の 2 重染色

ニューフクシン発色 (赤) : 抗 Melan-A 抗体 (clone:M2-7C10, ニチレイバイオサイエンス)

DAB 発色 (茶) : 抗 calretinin 抗体 (clone:SP13, ニチレイバイオサイエンス)

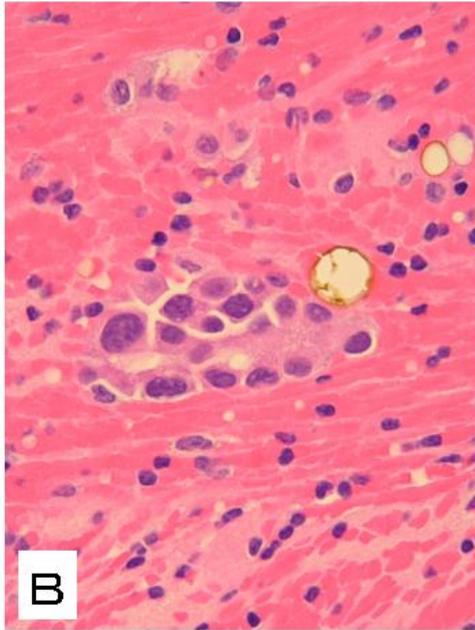
中皮細胞とほぼ同等の大きさのメラノーマ細胞が介在している

症例 3: 胸水 臨床診断: 肺腫瘍
 病理診断: 肺腺癌



A: Papanicolaou 染色

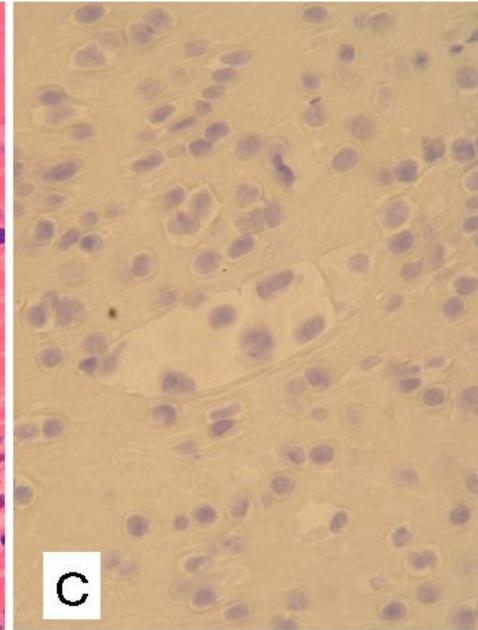
組織球を背景に, N/C 比の増大した異型細胞が集塊状に出現している



B

B: HE 染色

フィブリン様物質の中に異型細胞集塊を認める

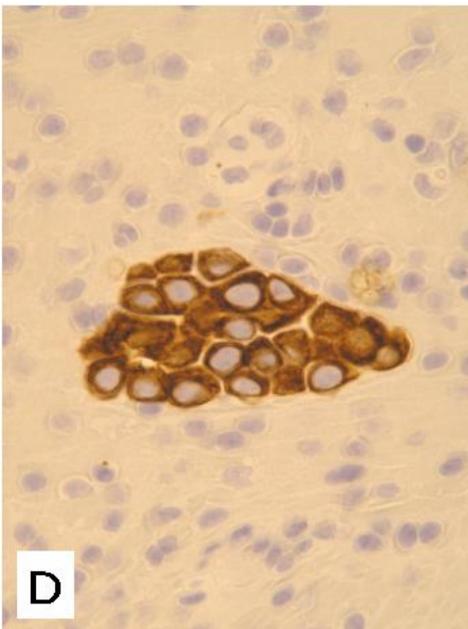


C

C: 抗 cytokeratin 20 抗体

(clone:Ks20.8, ニチレイバイオサイエンス)

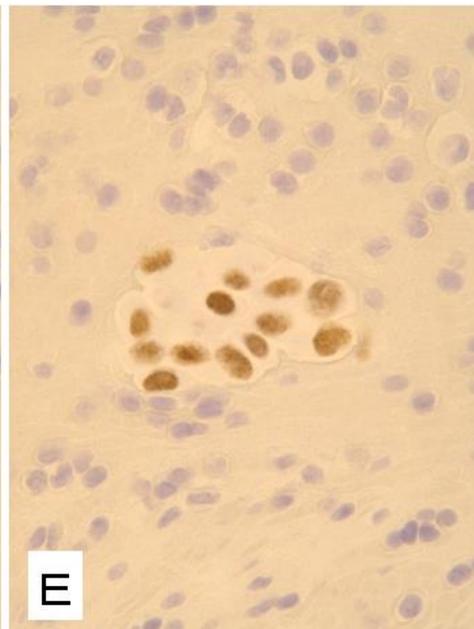
陽性像は認められない



D

D: 抗 cytokeratin 7 抗体
(clone:OV-TL 12/30, ニチレイバイオサイエンス)

細胞質にび漫性に陽性を示す



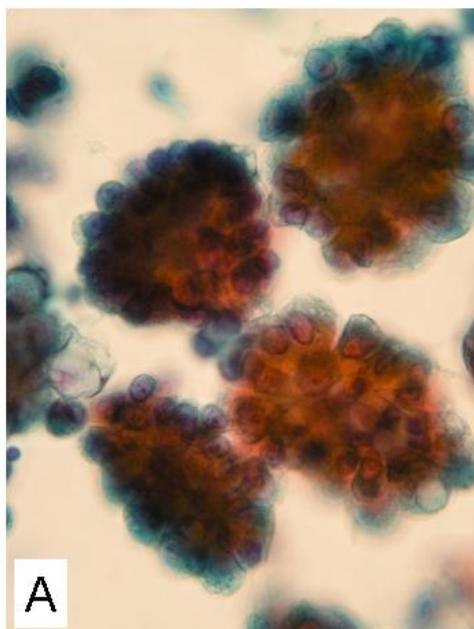
E

E: 抗 TTF-1 抗体 (clone:8G7G3/1)

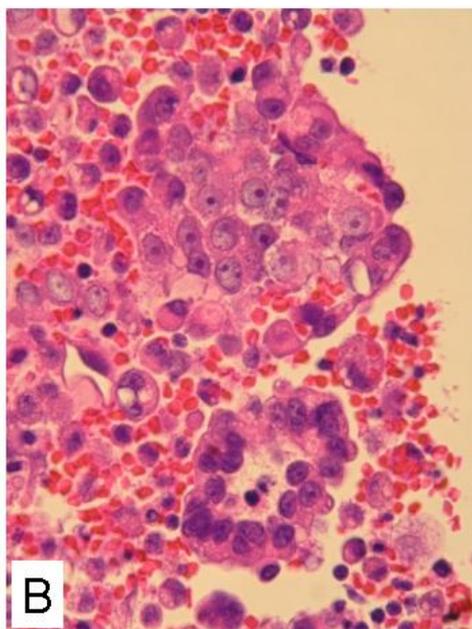
核に陽性像を認め、肺腺癌が疑われる所見である

症例 4: 腹水

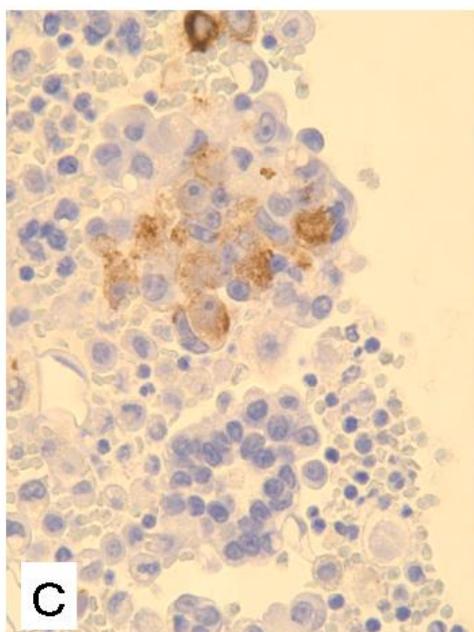
既往歴: 前立腺癌
病理診断: 前立腺癌



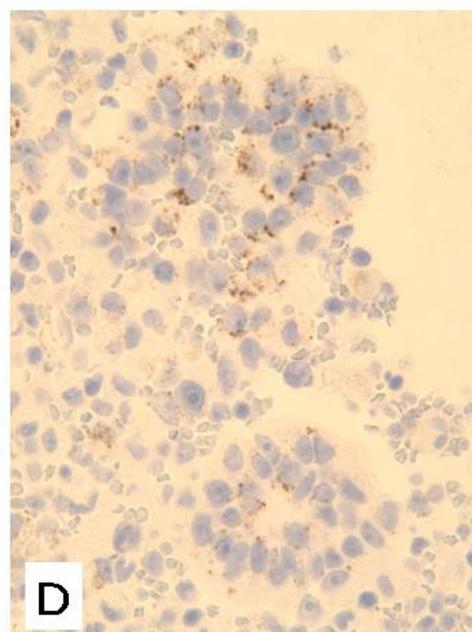
A: Papanicolaou 染色
乳頭状集塊が多数出現している



B: HE 染色
集塊状に癌細胞を認める

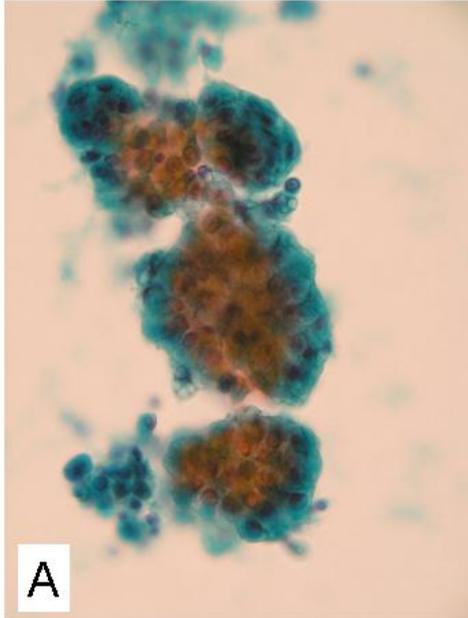


C: 抗 PSA 抗体 (polyclonal)
細胞質内に陽性像を認める



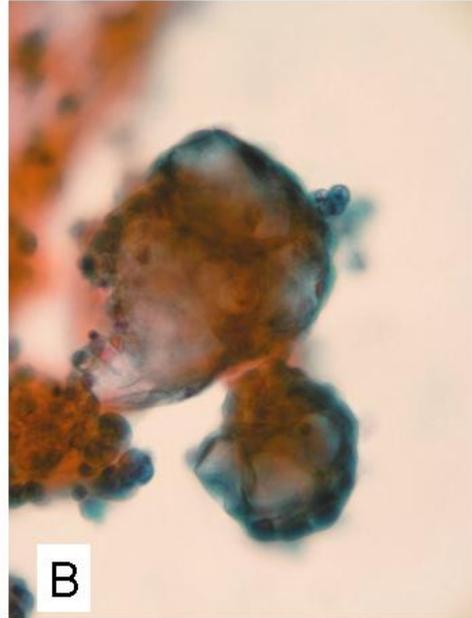
D: 抗 P504S 抗体 (clone:13H4)
細胞質内に顆粒状の陽性像を示す

症例 5: 胸水 既往歴: 腎細胞癌
 病理診断: 腎細胞癌



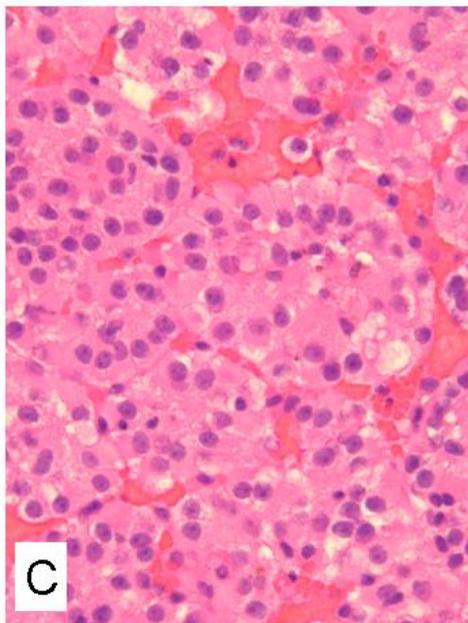
A

A: Papanicolaou 染色
 乳頭状集塊で出現している



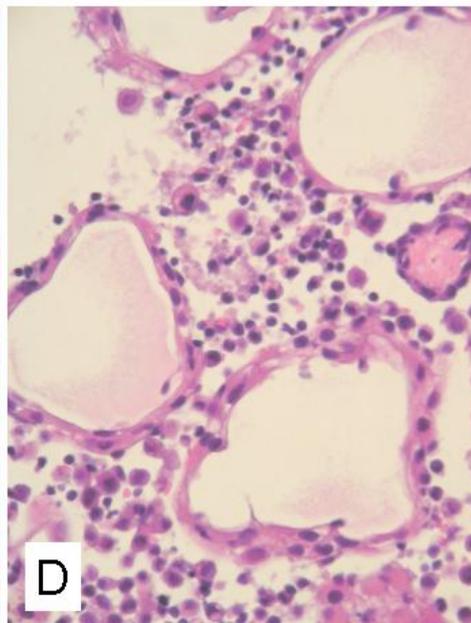
B

B: Papanicolaou 染色
 ミラーボール状に出現している



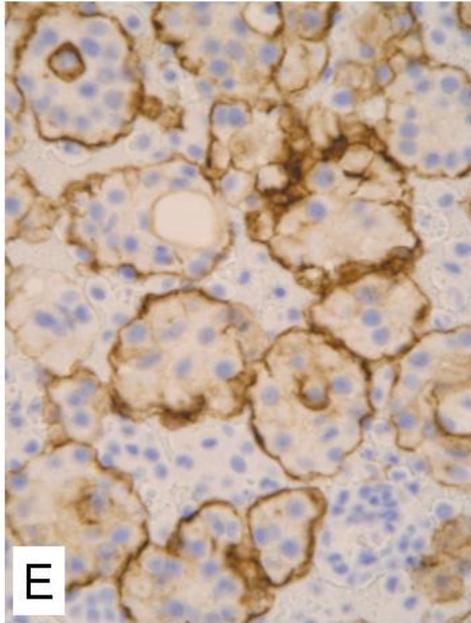
C

C: HE 染色
 A の乳頭状集塊は充実性巣状で出現している



D

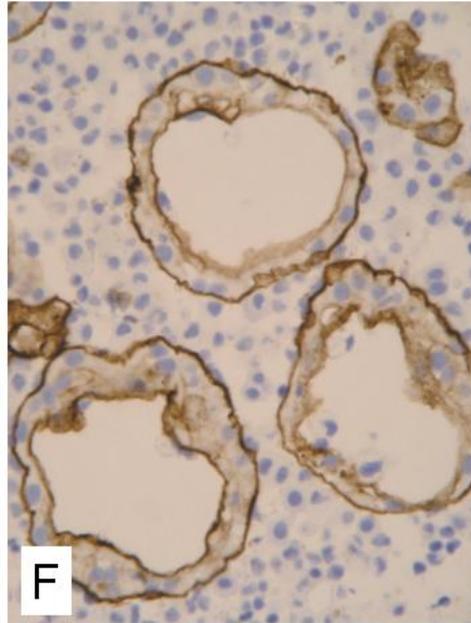
D: HE 染色
 B のミラーボール状集塊は中空状集塊として観察される



E

E: 抗 CD10 抗体 (clone:56C6)

乳頭状集塊を縁取る様に陽性像を認め、既往にある腎細胞癌が推定された



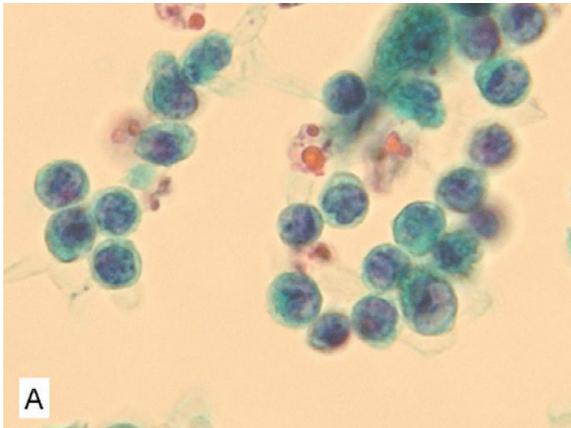
F

F: 抗 CD10 抗体 (clone:56C6)

中空状集塊の外側, 内側が陽性となる

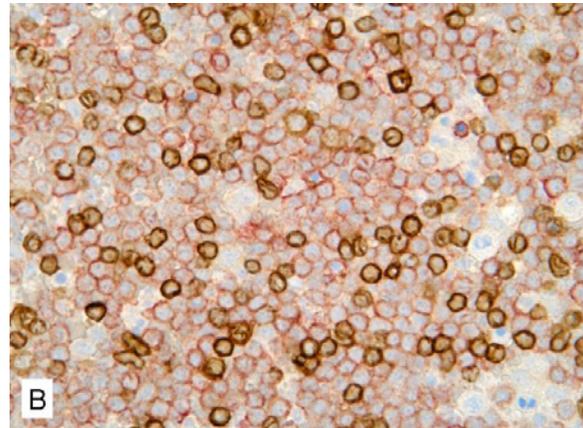
症例 6: 胸水

臨床診断: 結核性胸膜炎
細胞所見: 反応性リンパ球



A: Papanicolaou 染色

核形不整を伴う異型リンパ球が散見され、悪性リンパ腫も否定できないため、免疫染色を施行した

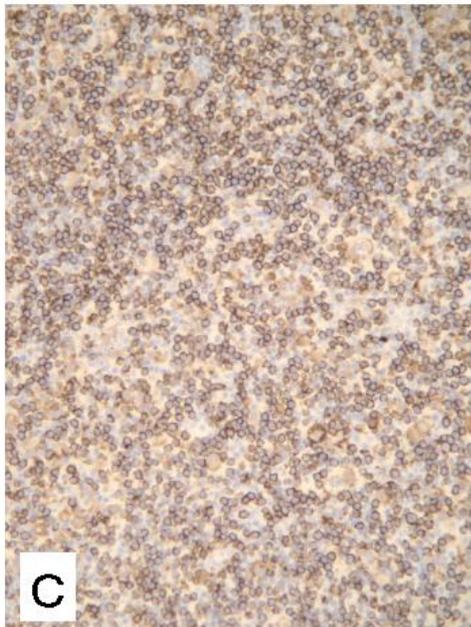


B: 抗 CD3 抗体と抗 CD79 α 抗体の 2 重染色

ニューフクシン発色 (赤) : 抗 CD3 抗体
(clone: SP7, ニチレイバイオサイエンス)

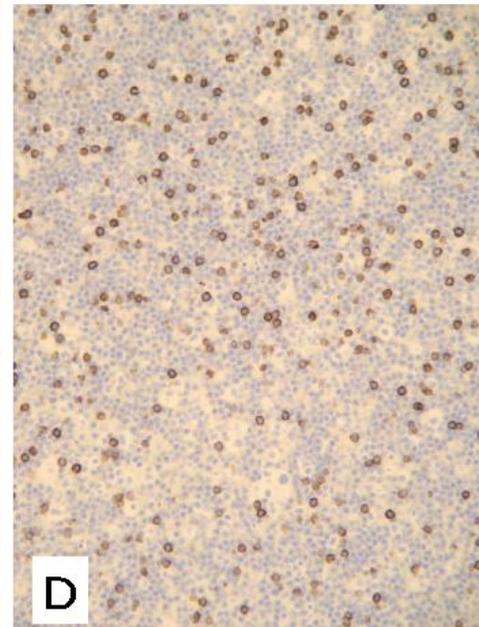
DAB 発色 (茶) : 抗 CD79 α 抗体
(clone: SP18, ニチレイバイオサイエンス)

抗 CD3 抗体と抗 CD79 α 抗体陽性細胞の比率は、3対 1 程度で、T 細胞優位である



C: 抗 CD4 抗体 (clone: 1F6, ニチレイバイオサイエンス)

抗 CD4 抗体陽性細胞は約 80% 程度である

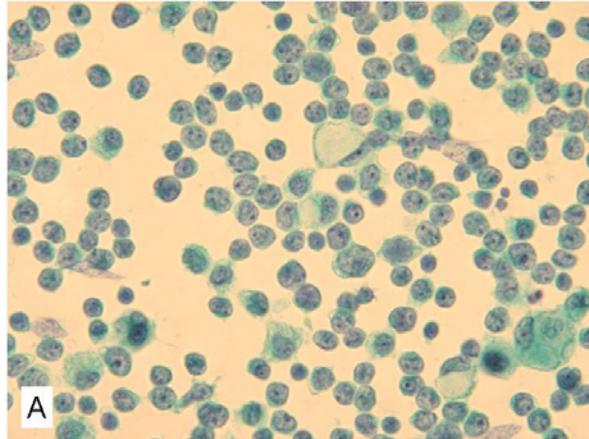


D: 抗 CD8 抗体 (clone: C8/144B, ニチレイバイオサイエンス)

抗 CD8 抗体は約 20% の細胞が陽性を示したことにより、胸水中に出現したリンパ球は反応性と判断した

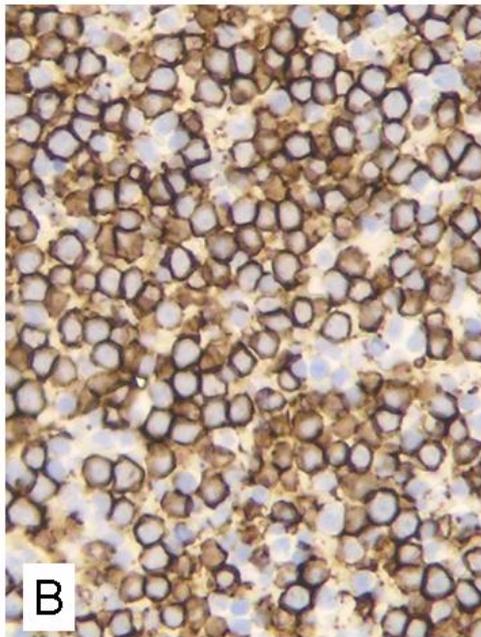
症例 7: 胸水

臨床診断: 傍大動脈リンパ節腫張
 病理診断: 悪性リンパ腫 (B 細胞性)



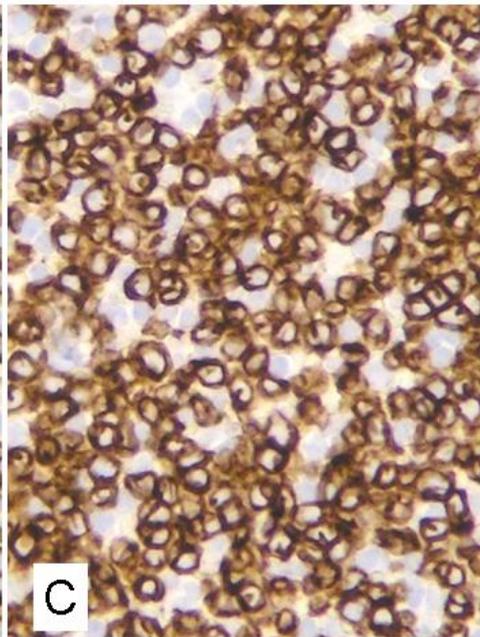
A: Papanicolaou 染色

核形不整を伴い、核小体の目立つ異型リンパ球が散見され、悪性リンパ腫が疑われたため、免疫染色を施行した



B: 抗 CD20cy 抗体 (clone:L26)

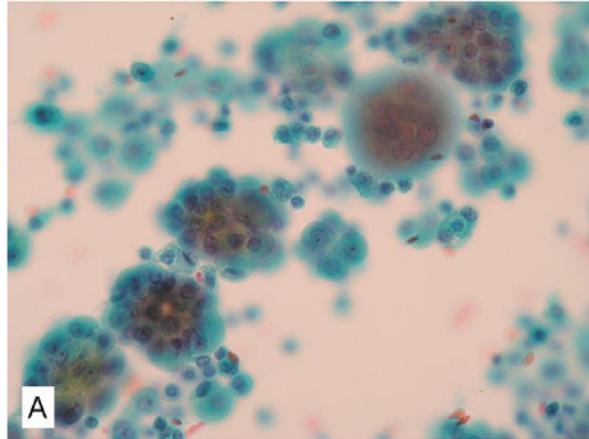
約 80% 程度の異型細胞が陽性となった



C: 抗 CD79α 抗体 (clone:JCB117)

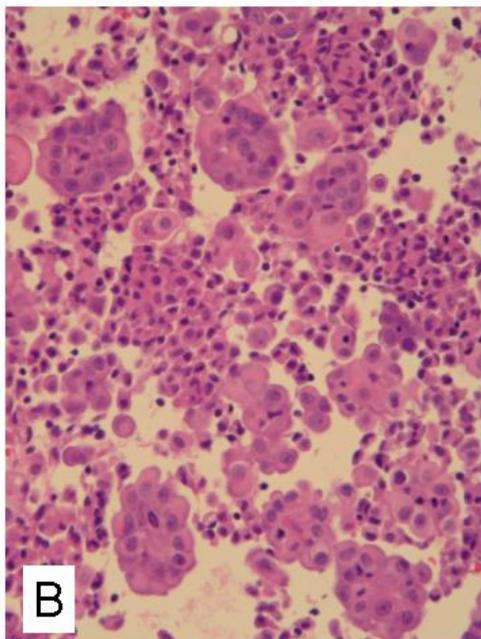
抗 CD20cy 抗体と同等の染色態度を示し、胸水中に出現した異型リンパ球は B 細胞性の悪性リンパ腫細胞と判定した

症例 8: 胸水 臨床診断: 大量胸水
 病理診断: 悪性胸膜中皮腫・上皮型



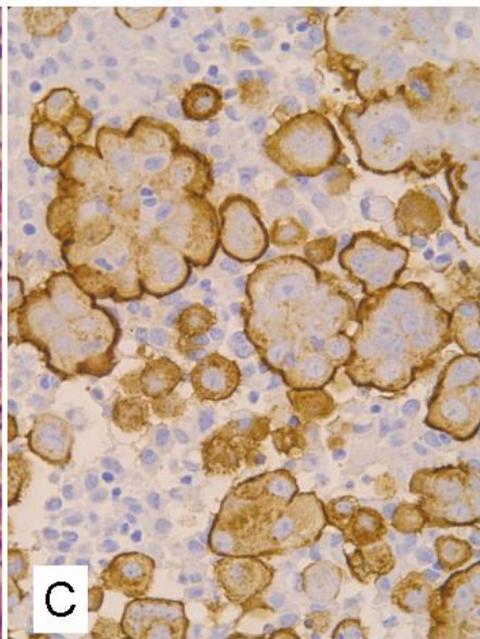
A: Papanicolaou 染色

球状の細胞集塊を多数認め、多核細胞も散見される。中皮腫細胞と腺癌細胞の鑑別のため、免疫染色を施行した



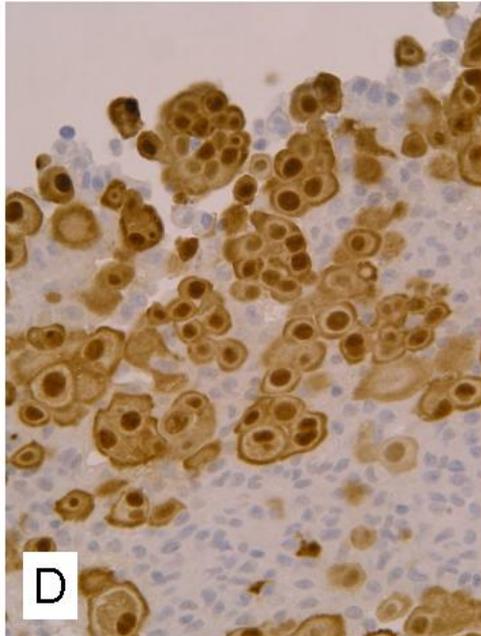
B: HE 染色

核小体の目立つ異型細胞が球状集塊を形成している



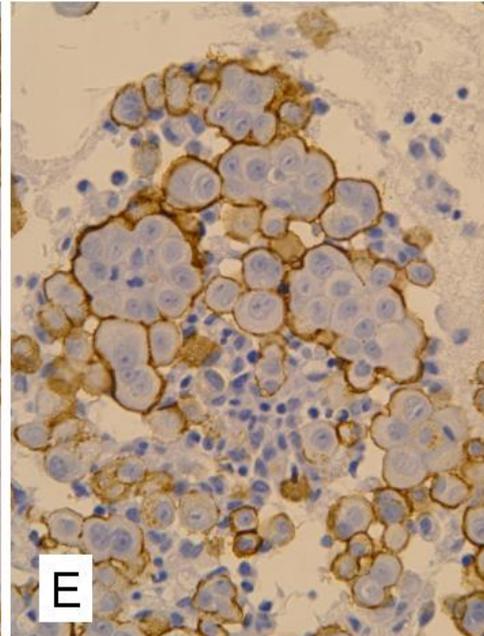
C: 抗 EMA 抗体 (clone: E29)

細胞集塊の辺縁主体に陽性像を認める



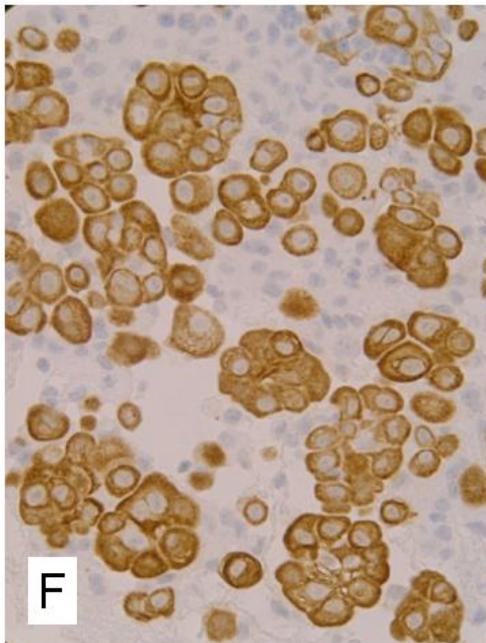
D: 抗 calretinin 抗体 (polyclonal, ZYMED, ニチレイバイオサイエンス code No 08-1211)

核および細胞質が陽性となる, いわゆる“fried egg”状の陽性像を示す



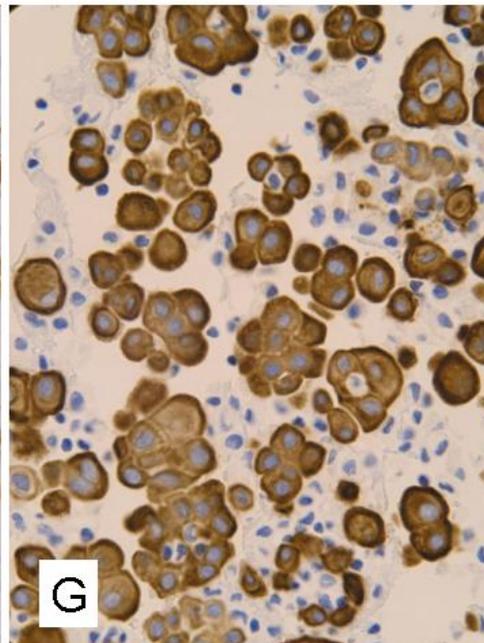
E: 抗 D2-40 抗体 (clone:D2-40)

細胞集塊の辺縁を縁取る陽性像を認める



F: 抗 cytokeratin5/6 抗体 (clone:D5/16 B4)

細胞質内にび漫性の陽性像を認める



G: 抗 cytokeratin 7 抗体 (clone:OV-TL 12/30, ニチレイバイオサイエンス)

細胞質内にび漫性の陽性像を認める

参考文献

- 1) 金子千之, 他: エンテランニュー封入剤を用いての細胞転写法. 臨床検査. 2000, 44 : 454
- 2) 福島範子, 他: セルブロック (cell block) 法. 検査と技術. 1975, 3 : 49-54
- 3) 畠山重春, 他: 液状検体よりのセルブロック標本の作り方. Medical Technology. 1999, 27 : 613-618
- 4) 夏目園子, 他: 子宮内膜細胞診におけるセルブロック法の検討. 1991, 30 : 657-661
- 5) 板東美奈子, 他: コロジオンバックを用いたセルブロック作製法. 臨床検査. 1994, 38 : 1335-1338
- 6) 三宅康之, 他: 胸腹水におけるコロジオンバックを用いたセルブロック組織診の意義. 臨床検査. 1997, 41 : 595-597
- 7) 伊藤 仁, 他: セルブロック作製法と病理, 細胞検査への応用. 検査と技術. 2002, 30 : 1387-1390
- 8) 濱川真治, 他: クライオバイアルを用いた簡易セルブロック法. 病理技術. 2004, 43 : 534
- 9) 川島活彦, 他: 寒天を用いたセルブロック法. 病理技術. 1983, 27 : 24-26
- 10) 牛島友則: 細胞診断および免疫染色に有用な cell block 標本作製法. 検査と技術. 2005, 33 : 19-26
- 11) 佐野順司, 他: アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法. 日臨細会誌. 2004, 43 : 534
- 12) 神谷 誠, 他: グルコマンナンを用いたセルブロック作製法. 病理と臨床. 2006, 24 : 871-875