 原 著

肝細胞癌の細胞所見と α -フェトプロテイン

——酵素抗体法の応用——

長崎大学医学部病理学第1教室¹⁾, 同 附属病院検査部²⁾, 大分医科大学附属病院検査部³⁾松尾 武¹⁾ 柴田 正則¹⁾ 穴見 正信²⁾ 林田 蓉子³⁾

われわれは肝細胞癌の細胞診における α -Fetoprotein (AFP) の診断的意義につき検討した。手術または剖検された肝細胞癌 15 例, 肝硬変症 1 例, 重複併合奇形腫 1 例, 胎児肝 3 例の肝穿刺物を Peroxidase-anti-peroxidase-method (PAP 法) により AFP の細胞内局在を同一症例の組織標本と対比し, さらに血清 AFP 値と肝細胞癌細胞 Grading の関係を調べた。肝細胞癌例の AFP-PAP 法の成績は, 細胞・組織標本とも陰性が 3 例, 細胞標本のみ陰性が 1 例, 残りの 11 例は陽性であった。3 例の陰性例のうち, 2 例では血清 AFP 値が低く, 1 例は治療の目的で塞栓術が行われたのち, 腫瘍が摘出され, 腫瘍細胞は広範に壊死に陥っていた。組織での Edmondson 分類に相当する肝細胞癌の細胞 Grading を試みた結果, 組織 Grade と細胞 Grade はほぼ一致した。血清 AFP と細胞 Grade の関係では, 細胞 Grade の高い例ほど血清 AFP 値も高値の傾向がみられた。

Key words: Liver—Immunoperoxidase technique—Alpha-fetoprotein—Hepatocellular carcinoma—Cytology

は じ め に

近年, 診断法の進歩により肝癌の早期診断が容易になってきたが, 確実な鑑別診断には組織診が必要である。また小口径針を用いる肝穿刺細胞診も有用なことが認められ, 広く行われているが^{1, 3, 4, 6, 8, 11~13)}, その診断の信頼性になお一部不安があると感じる。そこでわれわれは穿刺吸引法で得られた肝細胞癌細胞について, 腫瘍マーカーの 1 つ α -Fetoprotein (以下 AFP と略す) の産生能

を調べ, 腫瘍マーカーの細胞診への応用につき検討した。

材 料 と 方 法

昭和 58 年 10 月から翌年 5 月までの間に, 当院で手術または剖検された肝細胞癌例を中心にした 22 例 (表 1) を用いた。細胞標本は腫瘍または病変部が確実に採取できるよう直視下に穿刺吸引し, あるいは新鮮剖面より捺印しパニコロー染色とギムザ染色を行った。組織標本作製には抗原物質の消失を防ぐため融解温度 54°C 以下のパラフィンを使用した。AFP 酵素抗体染色法には米国 Immulok 社のヒストセット AFP を用い図 1 に示す手順で行った。AFP-PAP 法の成績は陽性細胞の局在分布の量と呈色の濃度により (—)~(卅) に分けた。血清 AFP 値は Radioimmunoassay (RIA) 法により測定した。肝細胞癌の組織診の細胞異型度は, わが国の原発性肝癌取扱規程⁵⁾ の分類に従った。一方細胞診の細胞異型度については次のように Grade I から IV までを分類した。

Grade I : 腫瘍細胞は正常肝細胞に酷似し, わずかに核の大小不同, クロマチン増量のみみられ, 小さな核小体

Alpha-fetoprotein and cytological findings of hepatocellular carcinoma — Application of immunoperoxidase technique —

Takeshi MATSUO, M.D. and Masanori SHIBATA
1st Department of Pathology, Nagasaki University
School of Medicine

Masanobu ANAMI, C.T., I.A.C.

Central Laboratory, Nagasaki University Hospital

Yoko HAYASHIDA, C.T., I.A.C.

Central Laboratory, Oita Medical University Hospital

論文別刷請求先 ☎852 長崎市坂本町 12 の 4 長崎大学医学部第 1 病理 松尾 武

昭和 60 年 3 月 11 日受付

昭和 60 年 12 月 20 日受理

表1 材料と方法

肝細胞癌	15例
(手術例)	8)
(剖検例)	7)
肝硬変	1例
胎児肝	3例
正常肝	2例
重複併合奇形腫	1例
細胞……………	穿刺吸引, 捺印標本
固 定:	95%エタノール・エーテル等量液
	4%パラホルムアルデヒド
	乾 燥
組 織……………	パラフィン包埋ブロック
固 定:	4%パラホルムアルデヒド
染 色	

ブロッキング	3%過酸化水素メタノール溶液
	↓ 室 温 10分間
ブロッキング	正常ヒツジ血清
	↓ 37°C 30分間
一 次 抗 体	抗 AFP ウサギ血清
	↓ 37°C 30分間
二 次 抗 体	抗ウサギ・ヒツジ血清
	↓ 37°C 30分間
標 識 抗 体	PAP
	↓
基 質 試 薬	DAB, AEC
	↓
核 染 色	メチールグリーン, ヘマトキシリン
	↓
封 入	バルサム, グリセリン

図1 酵素抗体 PAP 法 (米国 Immulok 社ヒストセット AFP)

を認める (写真1)。

Grade II: 腫瘍細胞の核は Grade I のものより一層大きく, 大小不同もきわだっているが, 細胞は平面的に配列し豊富な胞体を有している (写真2)。

Grade III: 腫瘍細胞の核, 核小体はともに大きく, クロマチンも増量し粗大顆粒状となり, 細胞質は少なく N/C 比が大となる。細胞の重積傾向もみられ, 異型性の著しい巨核や多核細胞がみられる (写真3, 4)。

Grade IV: 腫瘍細胞の N/C 比はさらに大となり, 細胞質は乏しく, 細胞相互の結合性も弱い (写真5)。

成 績

1. 症 例

AFP-PAP 法を用い検索した 22 例中の代表例を提示する。

a) 5 ヶ月ヒト胎児肝

組織, 細胞標本ともほぼすべての肝細胞は AFP 陽性であった (写真6)。

b) 肝細胞癌 (手術症例1)

63 歳, 男性。入院時の血清 AFP 値は 2,361 ng/mL。塞栓術治療後, 血清 AFP 値は低下した。手術時に腫瘍は 5.5×5.6 cm 大, 周囲肝組織に線維症がみられた。

組織所見: 腫瘍の一部は偽腺管型を示すが, 大半は索状型で Grade II carcinoma であった (写真7 a)。

細胞所見: 腫瘍細胞は広い泡沫状の胞体を有し, 核クロマチンは増量し, 軽度の核の大小不同がみられ, 核小体も増大していた。細胞 Grade II (写真8 a)。

AFP-PAP 法所見: 組織, 細胞標本とも陰性であった (写真7 b, 8 b)。

c) 肝細胞癌 (手術症例3)

56 歳, 男性。昭和 55 年 3 月肝硬変と診断され, 翌年 4 月血清 AFP 81.8 ng/mL となり肝腫瘍を含む肝部分切除が行われた。昭和 57 年 10 月血清 AFP 2,885 ng/mL に上昇したため第 2 回目の肝腫瘍切除術が行われた。腫瘍は 2.0×1.8 cm 大で, 肉眼的に肝硬変を伴っていた。

組織所見: 腫瘍は厚い索状型を示し Grade III carcinoma であった (写真9 a)。

細胞所見: 腫瘍細胞の結合性は弱く, N/C 比は大。核は類円形で切れ込みがみられ, クロマチンは増量し, 増大した核小体が目立った。細胞 Grade IV (写真10 a)。

AFP-PAP 法所見: 組織標本では半数ほどの腫瘍細胞に陽性反応がみられた (写真9 b)。細胞標本では, ほとんどすべての細胞が強い陽性反応を示した (写真10 b)。

d) 肝細胞癌 (手術症例4)

62 歳, 男性。肝シンチグラムで左葉に欠損像がみられ, 血清 AFP 値は 10,420~7,581 ng/mL であった。肝左葉切除術が行われ, 腫瘍は 3.2×3.7 cm 大で, ほかに小娘結節もみられた。

組織所見: 腫瘍は索状型, 一部充実型で Grade II carcinoma であった (写真11 a)。

細胞所見: 腫瘍細胞は結合性, 重積性を示し, N/C 比は中等大。核は長円形で不正がみられクロマチンは増量し, 核小体は小さかった。細胞 Grade III (写真12 a)。

AFP-PAP 法所見: 組織標本では大半の腫瘍細胞が陽性反応を示した (写真11 b)。細胞標本でも陽性反応がみられた (写真12 b)。

e) 肝細胞癌 (剖検例5)

49 歳, 男性。40 歳のとき肝硬変。胸部 X 線検査で肺転移性腫瘍を疑われて入院した。血清 AFP 値は 283,588

表 2 肝細胞癌手術例

例	年齢	性	AFP ng/ml	異型度		AFP 染色		備考
				組織*	細胞	組織	細胞	
1	63	男	1,000~2,369 (1,481)	II	II	(-)	(-)	塞栓術
2	36	男	42.4~139.5 (139.5)	II	II	(-)	(-)	
3	56	男	2.1~2,855 (2,855)	III	IV	(+)	(+)	再手術
4	62	男	4,659~10,420 (4,659)	II	III	(+)	(+)	
5	73	女	25~100,000 (19,997)	III	III	(+)	(+)	
6	35	女	99.6~43,646 (4,496)	II	II	(+)(+)	(+)	再手術
7	36	男	11.8~446 (446)	II	II	(++)	(+)	
8	72	男	430~850 (640)	II	III	(+)	(+)	

*原発性肝癌取り扱い規約⁵⁾による

表 3 肝細胞癌剖検例

例	年齢	性	AFP ng/ml	異型度		AFP 染色		備考
				組織*	細胞	組織	細胞	
1	58	男	4,845~23,430 (23,430)	III	IV	(+)	(-)	肝硬変 塞栓術
2	57	男	14,102~40,909 (26,489)	III	III	(+)	(++)	肝硬変 塞栓術
3	67	女	1,660~27,689 (2,881)	III	III	(+)	(++)	
4	70	女	51,200~141,820 (141,820)	IV	III~IV	(+)	(+)	肝硬変
5	49	男	222,339~283,588 (274,930)	IV	III~IV	(+)	(+)	肝硬変
6	58	女	2~336 (336)	III	III	(+)	(+)	アルコール 肝硬変
7	55	男	0	II	I~II	(-)	(-)	輸血 肝硬変

*原発性肝癌取り扱い規約⁵⁾による

ng/ml であった。肝の Computed Tomography (CT) 検査で肝中央部に 10×10 cm 大の腫瘤を認めた。1 ヶ月後、腹腔内出血で死亡し、剖検したところ、乙型肝炎と肝中央の腫瘍があり、両肺と気管分岐部、肺門リンパ節などに転移がみられた。

組織所見：腫瘍は厚い索状型から充実型を示し Grade IV carcinoma であった (写真 13 a)。

細胞所見：紡錘形の腫瘍細胞が重量性の細胞集塊をつくり、一部に腺管構造もみられたが、集塊辺縁のふちどり感がなく、細胞配列が不規則になっていた。核クロマチンは増量し、核小体も増大し N/C 比は大きく細胞 Grade III~IV であった (写真 14 a)。

AFP-PAP 法所見：組織標本では腫瘍細胞の大半が陽

性反応を示した (写真 13 b)。細胞標本でも強い陽性反応がみられた (写真 14 b)。

2. 肝細胞癌例の組織診断、細胞診断および AFP-PAP 法成績

肝細胞癌の手術例 8 例と剖検例 7 例の結果を表 2, 3 に示した。各症例の血清 AFP 値は経過中の最小値と最大値を記し、括弧内の値は材料採取直前の値である。血清 AFP 値は、剖検例 7 の 1 例を除いて全例が陽性 (20 ng/ml 以上) であった。

細胞異型度を組織診と細胞診で比較すると 15 例中 11 例で一致した。不一致の例でも著しい差はなかった。

AFP-PAP 法で組織、細胞標本ともに陰性の例が 3 例、組織標本は陽性で細胞標本のみ陰性の例が 1 例あった

図2 肝細胞癌の細胞 grading と血清 α-フェト
プロテイン値

が, 残りの11例では組織, 細胞標本ともに陽性であった。

3. 細胞像 Grading と血清 AFP 値の関係

各症例の細胞像 Grading と血清 AFP 値との関連を知るためにグラフを描いた (図2)。細胞像の異型度の高い肝細胞癌例に血清 AFP 値が高い傾向がみられた。

考 案

今回, われわれが検索した結果, 肝細胞癌 15 例中 11 例で細胞標本の AFP-PAP 法は陽性反応を示した。それらは組織標本の結果とも一致していた。4 例の陰性例のうち, 3 例では組織標本でも陰性であった。そのうち 1 例は, 血清 AFP 値が 0 ng/ml で非 AFP 産生癌と考えてもよく, 1 例は血清 AFP 値が 139.5 ng/ml で正常値 (20 ng/ml) を超えていた。AFP-PAP 法が陰性であった原因としては, 今回行った AFP 酵素抗体法の方法に問題点があり, 血清 AFP 値が 300 ng/ml 以下の低値の症例では陽性結果が得られないように感じた。また, ほかの 1 例では血清 AFP 値は 1,481 ng/ml の高値であったが, 治療の目的で塞栓術が行われ, 組織学的に腫瘍細胞は変性に陥り, 血清 AFP 値も漸次下降しつつあったことなどを考えると, 塞栓術が有効で細胞活性に影響を与えたとも想像できる。しかし, 材料採取, 固定, 染色の段階で何か問題があったかも知れない。これまでに細胞診に酵素抗体法を導入するにあたり, 塗抹方法, 固定液の種類, 検出法の比較, 消化法による特異免疫反応の増強などに多くの注意が払われてきた^{2,7,8,9)}。AFP に関しては, エーテル・アルコール等量液固定より, パラホルムアルデヒド固定標本の方が陽性細胞と背景のコントラストが明確と思われた。また組織, 細胞標本ともに細胞すべてが同一の反応を示さずに一部の細胞のみが陽性であったり, 反応の呈色の濃さに差がみられた。これは細胞の AFP 産生能を表現しているや否や不明である。今回の AFP-PAP 法では蛋白分解酵素による消化などは一切行っていない。

次に細胞診 Grading と AFP-PAP 法成績との関連には, とくに相関はみられなかった。細胞診 Grading と血清 AFP 値との関連を調べたところ, 細胞 Grade の高い症例ほど血清 AFP 値も高いことが判明した。

今回の検索で, AFP-PAP 法は肝癌, とくに肝細胞癌と転移性肝癌との鑑別, さらに肝細胞癌と胆管細胞癌 (肝内胆管癌) の鑑別診断に有用な方法と考えられた。

Summary

Embryo-specific α-fetoprotein (AFP) had been detected in serum and tissue from patients with neoplasms, particularly yolk sac tumors and hepatocellular carcinomas.

The presence and distribution of AFP in cytology aspirates from the liver were studied in 15 cases with hepatocellular carcinoma, one with liver cirrhosis, 3 of fetus, 2 of normal control and one with teratoma using the peroxidase-anti-peroxidase method (PAP). AFP-PAP method also was applied to tissue sections in each case for comparison.

Out of 15 cases with hepatocellular carcinoma, 11 were positive for AFP in both cytological and histological specimens. Three cases were negative for AFP and one was negative for AFP in cytological specimen although the histological specimen was positive.

An attempt was made to grade all the hepatocellular carcinomas using as a basis Edmondson's classification of histology, modified for applicability to cytological diagnosis. It was classified into four degrees of grading, according to (1) the N/C ratio, (2) size and degree of hyperchromatism of the nuclei, (3) quantity, granularity and acidophilic quality of the cytoplasm and (4) cohesive quality of tumor cells.

The degree of grading was parallel in both histological and cytological specimens. There was some correlation between the level of serum AFP and the degree of grading in cytology for all hepatocellular carcinomas.

Our preliminary results indicate that immunocytochemistry using AFP is helpful in cytodagnosis of primary hepatocellular carcinomas.

文 献

- 1) Johansen, P. and Svendsen, K.N.: Scan-guided fine needle aspiration biopsy in malignant hepatic disease, *Acta Cytol.*, 22: 292~296, 1978.
- 2) 川生 明, 稲葉義己: 酵素抗体法の細胞診への導入, 臨床

- 病理 (特集), 41: 33~44, 1981.
- 3) 松尾 武・他: 原発性肝癌の細胞診, 日臨細胞誌, 20: 56~63, 1981.
 - 4) 武藤邦彦・他: 腹部腫瘍 (主として肝, 胆, 脾) の超音波透導下穿刺吸引細胞診, 日臨細胞誌, 20: 657~669, 1981.
 - 5) 日本肝癌研究会編: 原発性肝癌取扱い規約, pp. 28, 金原出版, 東京, 1983.
 - 6) 及川正道・他: 肝穿刺細胞診—細胞診と最終診断の不一致例の検討を中心として—, 日臨細胞誌, 23: 563~570, 1984.
 - 7) 長村義之・他: 酵素抗体法の細胞診への応用—光顕, 電顕用染色手技確立と体腔液細胞診への応用—, 病理と臨床, 12: 1713~1719, 1983.
 - 8) Schwerk, W.B., et al.: Ultrasonically guided fine needle biopsies in neoplastic liver disease: Cytohistologic diagnoses and echo pattern of lesions, *Cancer*, 48: 1469~1477, 1981.
 - 9) 椎名義雄・他: 細胞診における酵素抗体法応用に関する基礎的研究, 日臨細胞誌, 21: 8~14, 1982.
 - 10) 椎名義雄・他: 細胞診への酵素抗体法の応用—酵素抗体間接法における pronase 消化効果—, 日臨細胞誌, 22: 218~227, 1983.
 - 11) Verma, K. and Bhargava, D.K.: Cytologic examination as an adjunct to laparoscopy and guided biopsy in the diagnosis of hepatic and gall bladder neoplasia, *Acta Cytol.*, 26: 311~316, 1982.
 - 12) 山本玲子・他: 超音波映像下経皮的肝穿刺による肝腫瘍の細胞診ならびに組織診, 日臨細胞誌, 22: 182~191, 1983.
 - 13) 山本玲子・他: 超音波映像下穿刺法による肝細胞癌の細胞診—特に細胞配列および PAS 染色所見について—, 日臨細胞誌, 23: 554~562, 1984.

図 の 説 明

- 写真 1 肝細胞癌, 細胞 Grade I (Pap. 染色, $\times 1,000$)
- 写真 2 肝細胞癌, 細胞 Grade II (Pap. 染色, $\times 1,000$)
- 写真 3 肝細胞癌, 細胞 Grade III (Pap. 染色, $\times 1,000$)
- 写真 4 肝細胞癌, 細胞 Grade III (Pap. 染色, $\times 1,000$), 多核巨細胞を混じる
- 写真 5 肝細胞癌, 細胞 Grade IV (Pap. 染色, $\times 1,000$)
- 写真 6 5 ヶ月ヒト胎児肝, AFP 陽性. a: 組織標本 (AFP-PAP 法, $\times 200$). b: 細胞標本 (AFP-PAP 法, $\times 400$)
- 写真 7 肝細胞癌 (手術症例 1), 組織標本 Grade II carcinoma. a: H-E 染色, $\times 400$. b: AFP-PAP 法陰性, $\times 200$
- 写真 8 肝細胞癌 (手術症例 1), 細胞標本, 細胞 Grade II. a: Pap. 染色, $\times 1,000$. b: AFP-PAP 法陰性, $\times 800$
- 写真 9 肝細胞癌 (手術症例 3), 組織標本 Grade III carcinoma. a: H-E 染色, $\times 400$. b: AFP-PAP 法陽性, $\times 400$
- 写真 10 肝細胞癌 (手術症例 3), 細胞標本, 細胞 Grade IV. a: Pap. 染色, $\times 800$. b: AFP-PAP 法陽性, $\times 1,000$
- 写真 11 肝細胞癌 (手術症例 4), 組織標本 Grade II carcinoma. a: H-E 染色, $\times 400$. b: AFP-PAP 法陽性, $\times 400$
- 写真 12 肝細胞癌 (手術症例 4), 細胞標本, 細胞 Grade III. a: Pap. 染色, $\times 800$. b: AFP-PAP 法陽性, $\times 800$
- 写真 13 肝細胞癌 (剖検例 5), 組織標本 Grade IV carcinoma. a: H-E 染色, $\times 400$. b: AFP-PAP 法陽性, $\times 200$
- 写真 14 肝細胞癌 (剖検例 5), 細胞標本, 細胞 Grade III~IV. a: Pap. 染色, $\times 800$. b: AFP-PAP 法陽性, $\times 1,000$

写真 1

写真 5

写真 2

写真 6

写真 3

写真 7

写真 4

写真 8

写真 9

写真 12

写真 10

写真 13

写真 11

写真 14