症 例

胸水中の骨肉腫細胞の酵素・免疫細胞化学的検索

——骨巨細胞腫との鑑別診断に有用であった1例——

滋賀医科大学病理学第2講座¹⁾, 同 整形外科²⁾, 同 中央検査部³⁾片岡 秀夫¹⁾ 天野 殖¹⁾ 笹原 正清¹⁾西岡 淳一²⁾ 杉山 繁雄³⁾

骨腫瘍の細胞診における acid および alkaline phosphatase の酵素, 免疫細胞化学的検索の有用性を明らかにする目的で, 胸水中に腫瘍細胞を認めた骨肉腫の1症例について細胞学的, および両酵素に対する酵素および免疫細胞化学的検索を行った。

胸水の腫瘍細胞の大半は紡錘形であり, 一部の細胞は小型の円形核を多数もつ破骨細胞類似の, あるいは多形性に富む多核巨細胞よりなっており, 生前には非上皮性悪性腫瘍と診断されたが, 骨肉腫および骨巨細胞腫の鑑別は困難であった症例である。

胸水塗抹標本中の腫瘍細胞の alkaline phosphatase は細胞膜および細胞質に陽性であり, 一方 acid phosphatase は陰性であり, 剖検時の腫瘍組織材料に対する組織化学的検索の結果とも一致し, 骨肉腫の診断が確定した。

細胞診においても, alkaline phosphatase, および acid phosphatase の検索より, 骨肉腫と骨巨細胞腫の鑑別診断が可能であることが示された。

Key words : Pleural effusion——Enzyme and immunocytochemistry——Osteo sarcoma——
Acid and alkaline phosphatase——Differential diagnosis

I. 緒 言

骨肉腫の診断は年齢, 発生部位, X線所見および病理

Enzyme and immunocytochemical study of osteosarcoma cells in pleural effusion — A case report with a reference on differential diagnosis of bone tumors —
Hideo KATAOKA, C.T., I.A.C., Shigeru AMANO, M.D., Masakiyo SASAHARA, M.D.

Department of pathology, Shiga University of Medical Science

Juniti NISIOKA, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Shiga University of Medical Science

Sigeo SUGIYAMA, M.T.

Department of Central Laboratory, Shiga University of Medical Science

論文別刷請求先 ☎520-21 大津市 瀬田 月輪町 滋賀医科大学病理学第2講座 片岡秀夫

昭和60年6月22日受付

昭和61年4月18日受理

組織学的に腫瘍細胞の類骨あるいは骨形成を確認することが重要といわれているが, ときに明瞭な類骨あるいは骨形成が認められず, その確定診断が困難な場合がある。また, 多核巨細胞を混えた骨腫瘍の場合には, 骨肉腫と骨巨細胞腫との鑑別診断がときに問題となる。組織化学的に骨肉腫では alkaline phosphatase (ALP-ase) 活性が強陽性であるのに対して, 骨巨細胞腫では acid phosphatase (ACP-ase) 活性が強陽性であることが知られている^{4,5)}。塗抹標本中の腫瘍細胞の ALP-ase および ACP-ase を酵素細胞化学的に, あるいは免疫細胞化学的に検索することにより, 骨肉腫および骨巨細胞腫の鑑別が可能となることが期待される。

われわれは生検組織において多核巨細胞の存在を特徴とし, 類骨あるいは骨形成所見がみられず, 悪性巨細胞腫との鑑別が困難であった骨肉腫症例を経験した。胸水の塗抹標本について ALP-ase および ACP-ase 活性を酵素細胞化学的に, また胸水塗抹標本および腫瘍組織の

ALP-ase の存在を免疫細胞組織化学的に検索し、両者の鑑別を試みたので報告する。

II. 症 例

患 者：19 歳，男性。

主 訴：右膝痛。

既往歴：斜頸，右足趾骨折。

現病歴：昭和 57 年 1 月頃より右膝痛が出現した。これはしだいに増強し、跛行をきたすようになった。4 月 26 日滋賀医科大学整形外科を受診し、X 線撮影により右大腿骨の骨幹端に骨軟化病変が認められた。臨床検査では、血清 ALP-ase の軽度上昇 (9.9 KA) を示したのみで、ほかに異常所見はなかった。5 月 25 日 open-biopsy を行い、骨原発の骨巨細胞腫 (grade-III) と診断された。8 月 6 日、右大腿骨切断および肺転移巣摘除を行った。58 年 8 月 19 日肺炎にて死亡し、剖検を行った。

III. 材料および方法

手術時および剖検時の肺転移組織および剖検時に得られた胸水を用い検索を行った。

胸水より塗抹標本を作製し、95% ethanol で固定後、Papanicolaou (Pap) 染色を行った。ALP-ase 活性の酵素細胞化学的検索には Burstone 法³⁾を、ACP-ase には Barka-Anderson 法²⁾を用いた。ALP-ase の免疫細胞化学的検索は酵素抗体間接法⁶⁾を用いた。1 次抗体には、肝/骨の抗ヒト ALP-ase ヒツジ血清 Merck 社を使用した。2 次抗体は peroxidase を標識した抗ヒツジ血清 Cappel 社を用い、3-3' diaminobenzidine にて発色させた。陰性対照は、1 次抗体に正常ヒツジ血清を用い、ほかは同様に操作した。

組織学的検索は formalin 固定、paraffin 切片について H-E, alcian blue 染色、Kossa 反応および酵素抗体間接法を行った。

IV. 結 果

剖検所見：右大腿は切断術後状態で、原発巣は認められず、転移は両肺および外腸骨リンパ節に認められた。両肺ともに胸膜との癒着が強く、右胸腔には黄色、軽度混濁した胸水が 60 ml 認められた。右肺下葉には超手拳大の壊死を伴う腫瘍形成がみられ、両肺実質内にはクルミ大以下の多発性転移があった。

胸水細胞像：胸水中の腫瘍細胞は大半が数個より多数

Fig. 1 Pleural effusion (Papanicolaou, ×400)

Fig. 2 Pleural effusion (Papanicolaou, ×400)

Fig. 3 Pleural effusion (Papanicolaou, ×400)

の細胞集団として認められた。大部分の細胞は紡錘形で、一部は楕円形を示した。細胞質はライトグリーンに好染し、緑色の顆粒が散見された。核は円形ないしは楕円形を呈し、顆粒状で豊富なクロマチンと著明な核小体が 1 個あるいは 2 個認められた (Fig. 1, 2)。少数ではあるが多彩な形態を示す多核巨細胞が認められた。濃染する広い細胞質中に多数の小型類円形核をもつものや (Fig. 3)、淡染した細胞質に大型で多形性に富む核をも

Fig. 4 Pleural effusion (Papanicolaou, $\times 400$)

Fig. 5 Primary tumor in the lower end of the right femur (H-E, $\times 200$)

Fig. 6 Metastatic tumor in the lung (H-E, $\times 200$)

Fig. 7 Alkaline phosphatase activity in pleural effusion cells with enzyme cytochemistry ($\times 400$)

Fig. 8 Alkaline phosphatase activity in pleural effusion cells with enzyme cytochemistry ($\times 400$)

Fig. 9 Alkaline phosphatase in pleural effusion cells with immunocytochemistry ($\times 400$)

つ巨細胞が認められた (Fig. 4).

組織所見: 手術時の骨腫瘍および肺転移巣の組織標本では, 破骨細胞様の多核巨細胞と, 異型を伴う紡錘形および多角形細胞の増生が認められた. ここには骨新生像は認められず, alcian blue 染色, Kossa 反応とも陰性で

あった (Fig. 5). 剖検時の肺転移巣の検索では, 紡錘形あるいは多彩な形態をとる腫瘍細胞が巨細胞を伴って増殖していた. 一部では腫瘍細胞による類骨および骨形

成が認められ、Kossa 反応は陽性であり、骨肉腫の組織像であった (Fig. 6).

酵素細胞化学および免疫細胞組織化学的所見：胸水の塗抹標本の酵素細胞化学的検索により、ALP-ase 活性は大部分の紡錘形細胞において強陽性であり、多核巨細胞は弱陽性を示した。反応は膜および細胞質に赤色の陽性反応として認められた (Fig. 7, 8)。ACP-ase 活性は陰性であった。酵素抗体間接法の ALP-ase 反応は胸水の腫瘍細胞および肺転移巣組織ともに細胞質は褐色の陽性反応を示した。胸水塗抹標本では、特に多核巨細胞の一部に強い陽性反応が認められた (Fig. 9)。紡錘形細胞は陽性であったが、細胞集団の中心部では弱い反応として認められた。対照標本では、背景全体にごく弱い呈色が認められた。

V. 考 察

本例は、生検組織で破骨細胞類似の多核巨細胞と、それを取り巻く紡錘形細胞の増生があったが、腫瘍細胞による類骨および骨形成が確認されず、骨巨細胞腫と診断された症例である。胸水中の塗抹標本でも Pap. 染色により、非上皮性悪性腫瘍との診断は比較的容易であったが、骨肉腫あるいは骨巨細胞腫の鑑別は非常に困難であった^{1,10)}。

骨肉腫の診断には年齢、発生部位、X 線所見、および病理診断を加えた総合的な判断が必要とされるが、最終的には病理組織学的に腫瘍細胞による類骨および骨形成を確認することが重要である。しかし chondroblastic, fibroblastic, および anaplastic osteosarcoma では腫瘍性類骨および骨のみられないものがあり、現在の診断的根拠は十分ではない⁷⁾。従来より骨原発の腫瘍組織中の ALP-ase 活性は骨肉腫では非常に高く、骨巨細胞腫、軟骨肉腫および線維肉腫では陰性か、または非常に弱いことが知られている^{4,5)}。一方 ACP-ase は骨巨細胞腫に強い活性が認められるが、骨肉腫および reactive osteoclastic giant cell では活性がないか、非常に弱い。したがって、腫瘍細胞の ALP-ase, ACP-ase 活性を細胞組織学的に検索することにより、骨肉腫および骨巨細胞腫の鑑別診断が可能である。ことに類骨あるいは骨形成の明らかでない骨腫瘍の場合には有用と考えられる。

今回、胸水の塗抹標本の酵素細胞化学反応の結果、ALP-ase は紡錘形細胞に強陽性、多核巨細胞は弱陽性であり、酵素抗体間接法の結果、紡錘形細胞および多核巨細胞ともに著明な陽性所見がみられた。一方 ACP-ase 活性は全く認められなかった。これらの両反応の結果、

本腫瘍が骨肉腫であることが確定された。これらの結果は Schjwze ら¹¹⁾による腫瘍組織に対する結果とも一致しており、ALP-ase, ACP-ase の細胞化学反応を行うことにより、細胞診においても骨肉腫と骨巨細胞腫の鑑別診断が可能であることが示された。

酵素抗体法を胸水での塗抹標本に応用するについては、種々の問題がある⁹⁾。特に細胞膜への抗体の透過性や、背景の非特異反応が問題となる。本例でも、細胞集団中央部で重積性のあるところは反応が弱かったが、これは抗体の透過性が低いことに基づくものと思われる。さらに、酵素抗体間接法を用いたため、多少の非特異反応がみられたが、陽性、陰性の判定は十分可能であった。

稿を終えるにあたり、ご指導ご校閲を賜りました挾間章忠教授に感謝いたします。

Summary

In order to differentiate whether a malignant bone tumor was osteosarcoma or a malignant giant cell tumor, enzyme cytochemistry and immunocytochemistry for alkaline phosphatase and acid phosphatase were performed on cell materials.

Tumor cells obtained by pleural aspiration showed mostly a spindle-shape. Small numbers of osteoclast-like cells or pleomorphic multinuclear giant cells were also found. Although a diagnosis of malignant bone tumor was possible, it was difficult to differentiate osteosarcoma from malignant giant cell tumor by usual cytological examinations. Using enzyme and immunocytochemical procedures, alkaline phosphatase activity was revealed along the plasma membrane or in the cytoplasm of the tumor cells, while acid phosphatase activity was not found. These results were coincident in the histochemical results of the tissue materials and a diagnosis of osteosarcoma was confirmed.

Enzyme and immunocytochemistry of alkaline phosphatase and acid phosphatase are effective in differentiating osteosarcoma from malignant giant cell tumor in the field of cytological diagnosis as they are in histochemical diagnosis.

文 献

- 1) Agarwal, P. K. and Wahal, K.M.: Cytopathologic study of primary tumors, bones and joints, *Acta Cytologica*, 27: 23~27, 1983.

- 2) Barka, T. and Anderson, P.J. : Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler, *J. Histo and Cytochem.*, 10 : 741~753, 1962.
 - 3) Burstone, M.S. : Histochemical comparison of Naphthol AS-Phosphates for the demonstration of phosphatases, *J. National Cancer Institute*, 20 : 601~615, 1958.
 - 4) Jeffree, G.M., et al. : Bone tumours and their enzymes: A study of the phosphatases, non-specific esterase and beta-glucuronidase of osteogenic and cartilaginous tumours, fibroblastic and giant-cell lesions, *J. bone and Joint Surgery*, 47B : 120~136, 1965.
 - 5) Levine, A.M. and Rosenberg, S.A. : Alkaline phosphatase levels in osteosarcoma tissue are related to prognosis, *Cancer*, 44 : 2291~2293, 1979.
 - 6) Nakane, P.K. and Pierce, G.B. : Enzyme labeled antibody: Preparation and application for the localization of antigens, *J. Histo and Cytochem.*, 14 : 929, 1967.
 - 7) Sanerkin, N.G. : Definitions of osteosarcoma, chondrosarcoma, and fibrosarcoma of bone, *Cancer*, 46 : 178~185, 1980.
 - 8) Schajowicz, F., et al. : Histochemical studies of bone in normal and pathological conditions, *J. Bone and Joint Surgery*, 36B : 474~489, 1954.
 - 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) 山田 喬 : 肉腫の細胞診, pp. 3~7, Muto Pure Chemicals Co., LTD, Tokyo, Osaka, 1980.
-