原 著

酵素抗体法の細胞診への応用

——特に粘性の少ない細胞診標本の固定法の検討——

日本医科大学第2外科¹⁾, 同 老人病研究所病理部²⁾, 慈山会付属病院³⁾秋丸 琥甫¹⁾ 庄司 佑¹⁾ 清水 一²⁾ 片山 博徳²⁾枝川 聖子²⁾ 横田 隆²⁾ 大網 弘²⁾ 坪井 栄孝³⁾

粘性に乏しい細胞診材料では、従来の湿アルコール固定後に免疫染色を行う過程で、頻回の洗浄によりスライドガラスから多くの細胞が剝離脱落するおそれがある。そこで、われわれは細胞の剝離を防ぐ固定方法を見出すべく、系代培養された CEA 産生のヒト結腸癌細胞株 C-1 浮遊液を用いて、種々の固定を施行後に CEA の免疫染色を試みた結果、塗抹後ただちにドライヤー（冷風）乾燥させ、4% パラホルムアルデヒド（PF）で固定する方法が細胞脱落が少なく胞体の CEA も良好に染色される成績が得られた。この固定方法で手術標本（43 例）に対して CEA 染色を行い、同一例の組織標本での CEA 染色成績と比較した。腺癌標本 27 例中 17 例が組織で CEA が陽性で、このうち 12 例（71%）が細胞標本で CEA 陽性であった。一方、同時に施行された湿アルコール固定細胞標本では 9 例（53%）が陽性であった。

免疫染色を行う細胞標本の性状（粘性の有無）によっては、従来の湿アルコール固定に加えて風乾 PF 固定も使い、細胞の同定に役立てたい。

Key words : Immunostaining——CEA——Paraformaldehyde fixation——Cytology specimen

I. 緒 言

日常臨床で得られる細胞診標本に対し、より正確な診断^{4,7)}を求めることを目的として、酵素抗体法を用いた CEA, keratin, AFP などの染色が行われてきている。細胞診標本の材料には、針穿刺吸引、捺印、喀痰のごとく

Immunocytochemical staining of cytology specimen—with special reference to appropriate fixation in non-viscous specimen—

Koho AKIMARU¹⁾, M.D., Tatsuku SHOJI¹⁾, M.D., Hajime SHIMIZU²⁾, C.T., I.A.C., Hironori KATAYAMA²⁾, M.T., Seiko EGAWA²⁾, C.T., Takashi YOKOTA²⁾, C.T., Hiroshi OAMI²⁾, M.D., Eitaka TSUBOI²⁾, M.D., F.I.A.C.

The Second Department of Surgery¹⁾, Institute of Gerontology²⁾, Nippon Medical School, Tokyo
Jisankai Cancer Institute Hospital³⁾

論文別刷請求先 ☎102 東京都千代田区飯田橋3の5の5 日本医科大学付属第一病院外科 秋丸琥甫

平成元年7月20日受付

平成元年8月25日受理

材料自体に粘性のある物と液状検体で粘性の乏しい物がある。粘性のない標本では、従来の湿アルコール固定後^{7,9)}に免疫染色を進めていく過程で、頻回の洗浄により、スライドガラスから多くの細胞が脱落するおそれがある。そこでわれわれは、細胞の脱落を防ぐ方法を見出すことを目的として、系代培養された癌細胞の浮遊液を検体に、種々の方法により免疫染色を行った結果、塗抹標本を乾燥固定後に免疫染色する方法のほうが、湿固定法の場合に比較して、細胞の脱落が少ないことを明らかにした。また、乾燥標本の固定液についても検討を行った。さらに、本法の有用性を証明すべく、外科手術材料より得られたスタンプによる細胞診標本で本法および湿アルコール固定による CEA の染色を行い、その結果と、同一の材料の組織標本での CEA 染色の結果とを比較検討した。本法の確立までの予備実験と、液状検体の細胞診標本での免疫染色における有用性を示す本実験の成績を、考察を加えて報告する。

表 1 実験 A (各種固定法による C-1 細胞標本の CEA 染色) の成績

固定方法	実施	モノクローナル抗体		ポリクローナル抗体	
		細胞量	染色態度	細胞量	染色態度
乾 Alc.	1	豊富	不良	豊富	良
	2	豊富	良	豊富	良
	3	豊富	不良	豊富	不良
	4	豊富	不良	豊富	良
乾 FA	1	豊富	良	豊富	やや不良
	2	少	良	少	良
	3	豊富	良	豊富	不良
	4	豊富	やや不良	豊富	やや不良
乾 PF	1	豊富	良	豊富	良
	2	豊富	良	豊富	良
	3	豊富	良	豊富	良
	4	豊富	良	豊富	良
湿 Alc.	1	乏	不良	少	良
	2	少	良	少	良
	3	少	良	乏	良
	4	少	良	少	良

乾 Alc.: 風乾アルコール固定

乾 FA: 風乾 10%ホルムアルデヒド固定

乾 PF: 風乾 4%パラホルム固定

湿 Alc.: 湿アルコール固定

細胞量: スライドガラス上に観察される

細胞の多寡を豊富, 中等量, 少量, 乏 (非常に少ない), に分けて表現した

染色態度: 全ての細胞の胞体が明らかに褐色に染まったものから, 染色されない細胞が多数みられるものまでを 3 段階にわけて, 各々, 良, やや不良, 不良とした

II. 実験 A (固定方法の検討)

粘性の少ない液状検体に免疫染色する際に, 細胞剥離の少ない細胞標本を作成する方法を確立することを目的として, 系代培養された癌細胞浮遊液を用いて以下のさまざまな方法で塗抹標本を固定, 染色した.

1. 材料と方法

1) 細胞標本

確立されたヒト CEA 産生結腸癌由来細胞株 C-1[®] の細胞浮遊液を 1,500 rpm で 10 分間遠沈後, スメアを以下の方法でそれぞれ 4 枚ずつ作成した. すなわち, a) ドライヤー (冷風) で乾燥後にアルコール固定 (以下, 乾 Alc. と略す), b) ドライヤー (冷風) で乾燥の後に 10%ホルムアルデヒドに 10 分間固定 (以下, 乾 FA と略す), c) ドライヤー (冷風) で乾燥の後に 4% パラホルムアルデヒドに 10 分間の固定 (以下, 乾 PF と略す), d) 湿ア

写真 1 a C-1 株細胞浮遊液の塗抹標本を風乾 4% パラホルム固定後の CEA 免疫染色標本. 頻回の洗浄でも細胞が豊富に固着している. ヘマトキシリンによる核染色を施行 (40×)

写真 1 b C-1 株細胞浮遊液の塗抹標本を湿アルコール固定後の CEA 免疫染色標本. 頻回の洗浄操作により細胞数は乏しくなっている. ヘマトキシリンによる核染色を施行 (40×)

ルコール固定 (以下, 湿 Alc. と略す) の 4 法に分け, それぞれは固定後に CEA の免疫染色 (以下, 2 に詳述) をモノクローナル抗体 (Bio-science products 社製, CEA monoclonal parlam 4) ポリクローナルの抗体 (国際試薬株式会社製, CEA ヒストセット) を用いて, 各方法 2 枚ずつ, 5 月, 6 月, 7 月, 8 月にそれぞれ 1 回ずつの実験を施行した.

2) CEA 染色

以下に手順を述べる.

- 0.3% H_2O_2 加メタノールにて, 内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングを 5 分間行ってリン酸緩衝液にて洗浄.
- 正常ヒツジ血清による 20 分間のブロッキング後, 洗浄.
- 一次抗体 (ウサギ血清) を 1~3 滴載せて室温にて 20 分間反応後, 洗浄.
- 二次抗体 (抗ウサギ・ヒツジ血清) を 1~3 滴載せ

表 2 対象症例

組織型	原 発 巣
腺 癌 (27例)	胃11, 結腸7, 直腸2, 胆嚢2, 肺3, 乳腺2
扁平上皮癌 (5例)	肺3, 食道2
その他 (11例)	肝臓2, 乳腺2, 肺1, 胸腺1, 胃1, 脾臓1, リンパ節2, 後腹膜1

て室温 20 分間反応後, 洗浄.

e. 標識抗体 (PAP 抗体複合物) を 1, 2 滴載せて室温で 20 分間反応後, 洗浄.

f. DAB による発色 (Karnovsky 液) で約 10 分間反応の後, 洗浄.

g. ヘマトキシリンによる核染色.

2. 成 績

細胞標本の各種固定法後の CEA 染色 (モノクローナルとポリクローナル抗体) 結果を表 1 に示す. 合計 4 回行った結果, スライドガラス上の細胞数に関しては, 風乾標本が湿固定標本と比較し, 豊富に固着しており, 細胞剥離のない点ですぐれていた (写真 1 a, b). 染色態度では乾 PF, 湿 Alc., 乾 FA, 乾 Alc. の順によく染まった (写真 2 a, b, c, d). また, 乾 PF では, 染色実施時期に関係なく一定の良好な成績が得られた. モノクローナル抗体とポリクローナル抗体との間で, 染色態度に差はなかった.

III. 実 験 B

実験 A の成績結果により, 風乾 PF 固定と湿 Alc. 固定による細胞標本の CEA 染色を臨床材料で行い, さらにその同一症例の組織標本でも CEA 染色を行って, これらの染色結果を比較し, 乾 PF 固定法の有用性を検討することを目的とした.

1. 材料と方法

胸部および腹部手術で得られた胸水や腹水のスメア, あるいは摘出標本の捺印標本につき, 風乾 PF 固定と湿 Alc. 固定の後に, それぞれ CEA 染色を, 同時にパパニコロー染色も行った. また, 同一症例の手術材料より得られた永久組織標本につき, H-E 染色および CEA 染色を実施した. 対象症例を表 2 に示すが, 組織型は腺癌 27 例 (胃 11, 結腸 7, 直腸 2, 胆嚢 2, 肺 3, 乳腺 2), 扁平上皮癌 5 (肺 3, 食道 2), その他の腫瘍あるいは良性疾患 11 例であった. 各症例とも, 血中 CEA 値が測定

表 3 腺 癌

Case	組 織 診	血中 CEA	組織 染色	細胞標本 CEA 乾 PF 湿 Alc.
1	肺 (中分化)	ND	+	+
2	胆嚢 (中分化)	—	+	+
3	胃 (中分化)	—	ND	+
4	直腸 (高分化)	—	+	+
5	胃 (低分化)	+	—	—
6	結腸 (中分化)	—	—	—
7	乳腺 (面皰性)	—	—	—
8	結腸 (高分化)	+	+	—
9	胃 (印環細胞)	+	+	—
10	肺 (低分化)	ND	ND	—
11	肺 (中分化)	+	+	+
12	結腸 (高分化)	+	+	+
13	胆嚢 (高分化)	+	+	—
14	結腸 (中分化)	—	+	—
15	胃 (低分化)	+	+	—
16	胃 (低分化)	—	+	—
17	胃 (中分化)	+	+	+
18	胃 (中分化)	+	+	—
19	結腸 (高分化)	—	—	—
20	胃 (低分化)	ND	—	+
21	胃 (中分化)	ND	+	+
22	結腸 (高分化)	—	—	+
23	胃 (印環細胞)	+	+	+
24	直腸 (高分化)	—	+	—
25	結腸 (中分化)	+	—	—
26	胃 (中分化)	—	+	+
27	乳腺 (髄様癌)	—	—	—

ND: 実施せず.

された. 各々の標本の CEA 染色には, ポリクローナル抗体 (国際試薬株式会社ヒストセット) を使用したが, ロットが変わるたびに positive control (CEA 陽性標本) を, 染色のたびに negative control (非免疫血清) をおいた.

以上, 同一症例より得られた細胞診標本の CEA 染色結果を, 組織標本の CEA 染色結果および血中 CEA 値と比較検討した. CEA 値は, 正常値を越えるものを陽性 (+), 以下を陰性 (—) とした. また, 染色結果では, 胞体内が明らかに褐色に染色されている場合のみを陽性 (+) とし, それ以外を陰性 (—) とした.

2. 成 績

腺癌 27 例 (表 3) は, 血中 CEA 値が 23 例で測定され 11 例 (48%) に陽性を示したが, 手術材料の組織での CEA 染色結果は 25 例中 17 例 (68%) が陽性であった. 次に細胞標本であるが, 風乾 PF 15 例 (写真 3 a, b, 4 a, b), 湿 Alc. 12 例で, 固定後の CEA 染色結果が陽性であった. 組織標本での陽性例からみると, 17 例中 9 例

表 4 扁平上皮癌

Case	組織診	血中 CEA	組織 CEA	細胞標本 CEA 乾 PF 湿 Alc
1	肺(中分化)	—	—	—
2	肺(中分化)	—	—	—
3	食道(高分化)	ND	+	—
4	肺(高分化)	—	—	—
5	食道(高分化)	ND	—	—

乾 PF: 風乾パラホルム固定

湿 Alc.: 湿アルコール固定

表 5 その他

Case	組織診	血中 CEA	組織 染色	細胞標本 CEA 乾 PF 湿 Alc.
1	胃(腺扁平上皮癌)	+	+, —	—
2	乳腺症	—	—	—
3	乳腺症	—	ND	—
4	Castleman リンパ腫	—	ND	—
5	リンパ節炎	ND	ND	—
6	臍 (oncocytic cell carcinoma)	—	—	—
7	肺 (小細胞癌)	—	—	—
8	後腹膜 (神経芽細胞腫)	—	—	—
9	胸腺腫	—	—	—
10	肝細胞癌	—	—	—
11	肝細胞癌	—	—	—

が血中 CEA 陽性, また 17 例中 12 例が細胞標本のいずれかの固定法により CEA 染色が陽性と認められた。

扁平上皮癌 5 例 (表 4) は, 血中 CEA 値が 3 例で測定され全て陰性であったが, 組織標本での CEA 染色結果は 5 例中 1 例が陽性であった。また, 細胞標本では乾 PF 固定も湿 Alc. 固定も, CEA 染色は全て陰性であった。

その他の悪性腫瘍, および良性疾患 11 例 (表 5) では, 胃の腺扁平上皮癌の 1 例のみが血中 CEA 値および組織標本での CEA 染色がともに陽性 (組織では腺癌部分のみが染まり, さらに同一標本での keratin 染色も試み, 扁平上皮癌部分のみが染色された) であった。しかし, この例も含め細胞標本の CEA 染色結果は全て陰性であった。

ここで表 3, 4 および 5 で示した全ての細胞標本の CEA 染色結果を, 細胞標本の固定方法 (乾 PF と湿 Alc.) 別に, 組織での CEA 染色結果と比較したのが, 表 6 である。組織の CEA 陽性であった腺癌 17 例, 扁平上皮癌 1 例, その他 1 例と比較した。

風乾 PF 固定 (表 6 a) は腺癌 15 例の細胞標本で CEA 陽性, さらに組織および細胞ともに CEA 陽性のものは

表 6

a. 風乾パラホルム固定 (43例)

組織型	CEA 陽性		
	組織	細胞	一致
腺癌 (27)	17	15	12
扁平上皮癌 (5)	1	0	0
その他 (11)	1	0	0

b. 湿アルコール固定 (43例)

組織型	CEA 陽性		
	組織	細胞	一致
腺癌 (27)	17	12	9
扁平上皮癌 (5)	1	0	0
その他 (11)	1	0	0

12 例であった。

湿 Alc. 固定 (表 6 b) は腺癌 12 例の細胞標本で CEA 陽性であり, 組織でも陽性であったものは 9 例であった。

IV. 考 案

細胞診標本に対する酵素抗体法の応用^{2,4,5,7)} は, 細胞の持つ抗原, たとえば CEA, keratin, AFP などを同定することにより, 従来の形態学的観察に加えた癌細胞の鑑別診断法として有用である。しかし, 標本の中には穿刺吸引やスタンプ, 喀痰や粘性のある貯留液などと異なり, 粘性に乏しい液状標本もみられる。このような場合には, 免疫染色過程において頻回の洗浄が行われるので, かなりの数の細胞がスライドガラスから脱落する。この脱落を防ぐ方法として, 冷風による乾燥塗沫が, CEA 産生の培養細胞浮遊液を使用して検討され, 細胞脱落のないことが証明された (実験 A の成績, 表 1 参照)。以前, われわれは, 細胞剥離脱落を防止する目的で, 霜降りスライドガラスや卵白アルブミンやサイトスプレーをかけたスライドで標本を作成したことがあるが, 標本の背景が醜いために, それ以来行わなくなった。また, 各種固定液による免疫染色結果の検討 (表 1 参照) では, アルコールは風乾標本よりも湿固定標本において良好に染色され, 風乾標本において使用された 10% FA と 4% PF では, 4% PF が気温に関係なく一定してよく染色された。要するに, 細胞剥離の心配がない標本であれば, 従来の湿 Alc. 固定で, 細胞剥離しやすい標本の場合には, 風乾 PF 固定で良好な染色が得られると思われる。

次に, 細胞標本の CEA 染色を 43 例の手術材料に実施し, 同一の組織標本での CEA 染色と比較検討した実

験Bの結果では、風乾PF固定では腺癌の組織陽性17例中12例(71%の一致率)に細胞標本の胞体内が明らかなCEA陽性を認めている。さらに、湿AIC.固定の場合は腺癌の組織陽性17例中9例(53%)に細胞標本の成績との一致がみられた。このように、2つの固定法による細胞標本のCEA染色陽性率が組織標本での陽性率より低い理由として、組織標本での胞体内のCEAは免疫染色に際し抗体と直接触れるが、一方、細胞標本では抗体は細胞膜を通して胞体内のCEAと反応しなくてはならないことが考えられる。また、組織と細胞標本での陽性一致率が、風乾PF固定で71%(湿AIC.固定では53%)と高い理由に、細胞標本の固定方法が抗体の細胞膜通過性⁹⁾になんらかの影響を与えていると考えられる。さらに、表3に示した症例14~16では組織のCEAが陽性であったが、細胞標本を湿AIC.固定したCEA染色は陰性であり、これらをさらにPFで固定したところ、全例が陽性となった。このことは、実験Aの成績や、乾PF固定による細胞標本の陽性一致率が高かったことと合わせ考えると、PFによる固定が抗体の細胞膜通過性に好都合であると思われる。

血中CEAと組織のCEAとの関連性を表3、4および5でみると、血中、組織ともに陽性が10例、血中陽性、組織陰性は2例、血中陰性、組織陽性が6例、で全体の不一致は44%(8/18)である。この不一致、すなわち組織陽性で血中陰性の場合にはCEA産生細胞の全体数が少なく、また組織陰性で血中陽性の場合には組織染色と血中CEA測定の方法の内容や性質に差があると考えられる。しかし、前者の場合に対する説明としては、われわれの症例は進行癌で組織が陽性ならば血中も陽性のはずであり、使用した抗体がpolyclonalで陽性率が高く出た^{1,6)}ためか、あるいはCEAを産生している癌細胞としていない癌細胞が存在する¹⁰⁾なかで、全体としては産生しない癌細胞が多かったが、染色に使用された標本内にたまたまCEAを産生する癌細胞が多く得られたと考える方が妥当である。さらに、後者の場合の不一致の説明としては、癌病巣全体ではCEA産生する細胞が多く存在するなかで、組織の染色標本内にCEAを産生しない癌細胞が多く得られたと考えられる。

CEAの局在に関して種々の報告^{2,3,6,7,11)}が散見されるが、われわれは胞体内^{3,6,7)}が明らかに染色された場合を陽性とみなした。これは、組織標本でも細胞標本の場合でも染色結果の判定が明瞭で容易であると考えたからである。

以上、CEAの免疫染色を、細胞標本と組織標本に行ってきたが、細胞標本、特に粘性に乏しい細胞浮遊液検体

では風乾PF固定が、染色過程での細胞剥離脱落が少なく染色結果も良好で、組織標本での染色結果によく一致したので、今後も免疫染色を行う細胞標本の性状(粘性の有無)によっては、従来の湿AIC.固定に加えて、風乾PF固定法も用い、細胞の同定や癌細胞の鑑別に役立てたい。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました日本医科大学老人病研究所病理学教室の故金子仁先生に深謝いたします。

本論文の要旨は、第26回日本臨床細胞学会総会(東京)に於いて発表した。

Summary

Frequent washing of cytology specimens during immunostaining procedures can result in cells slipping off slides, especially when the specimen is from a non viscous cell suspension. Using CEA producing colonic cancer cell line (C-1) we investigated various methods of fixing cells on slides before staining.

The best results was achieved by drying cells quickly on the slides after smearing, and fixing them with 4% paraformaldehyde solution (PF). This method yielded cell rich slides, even after frequent washings, and beautifully stained CEA in the cytoplasm. This method was applied to CEA staining on smears of 43 surgical specimens. Cytologically stained CEA with this fixation was seen in 12 (71%) out of 17 histologically CEA positive specimens, while the cells fixed conventionally with alcohol showed 9 (53%) CEA positive specimens.

The method of drying and fixing smears with PF should be adopted in immunostaining especially of non-viscous cell suspensions, because it yields richer cellularity and better staining.

文 献

- 1) Hammarstrom, S.: Chemistry and immunology of CEA, CA 19-9, and CA-50, pp. 34~44, Tumor marker antigens, Student litteratur, Sweden, 1985.
- 2) 秦 宏樹・他: 酵素抗体法を用いたCEAの細胞組織学的検討, 日臨細胞誌, 23: 111~117, 1984.
- 3) 平田 稔・他: 胃癌における組織CEAの臨床病理学的検討, 癌の臨床, 28: 1608~1614, 1982.
- 4) 今井 督・他: 肺癌細胞診におけるCarcinoembryonic Antigen, Secretory, Component, Keratin, 粘液染色による組織型推定, 日臨細胞誌, 24: 13~23, 1985.

- 5) 川生 明, 稲庭義巳: 酵素抗体法の細胞診への導入, 臨床病理, 41: 33~44, 1980.
 - 6) Kuhajda, F.P., Offutt, L.C. and Mendelsohn, G.: The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma, *Cancer*, 52: 1257~1264, 1983.
 - 7) Nadji, M.: The potential value of immunoperoxidase techniques in diagnostic cytology, *Acta Cytologica*, 24: 442~447, 1980.
 - 8) 佐藤正典・他: ヒト CEA 産生結腸癌由来細胞株 (C-1 株) の樹立とその性状, 医学のあゆみ, 96: 876~877, 1976.
 - 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) 豊野 充, 鈴木清夫: 胃癌およびそのリンパ節転移における組織 CEA 染色と血清 CEA 値の比較検討, 癌の臨床, 29: 225~227, 1983.
 - 11) 上原克昌・他: 胃癌および大腸癌における CEA の意義, 日外会誌, 86: 435~442, 1985.
-

写真2 a: 風乾4%パラホルム固定後のCEA染色。胞体内がよく染色され、細胞数も豊富である(ヘマトキシリン核染色, 400×) b: 湿アルコール固定後のCEA染色。胞体内は良好に染色されているが、細胞数は少ない(ヘマトキシリン核染色, 400×) c: 風乾10%ホルムアルデヒド固定後のCEA染色。胞体内の染色態度は劣るが、細胞はよく固着している(ヘマトキシリン核染色, 400×) d: 風乾アルコール固定後のCEA染色。細胞の脱落は少ないが、胞体内の染色態度が不良である(ヘマトキシリン核染色, 400×)

写真3 a: 72歳男性の胃癌(中分化型腺癌)切除材料のスタンプ標本。風乾4%パラホルムアルデヒド固定後のCEA染色(ヘマトキシリン核染色, 600×) b: 同一材料の組織標本でのCEA染色(ヘマトキシリン核染色, 400×)

写真4 a: 47歳女性の胃癌(未分化型腺癌)切除標本のスタンプ標本。風乾4%パラホルムアルデヒド固定後のCEA染色(ヘマトキシリン核染色, 600×) b: 同一材料の組織標本でのCEA染色(ヘマトキシリン核染色, 400×)