原 著

銀染色の中皮細胞同定への応用

宮城県立がんセンター¹⁾, 東北大学医学部放射線科²⁾

小室 邦子¹⁾ 小野寺博義¹⁾ 武田鐵太郎¹⁾ 大沼真喜子¹⁾
 村田 孝次¹⁾ 松田 堯¹⁾ 中村 克宏¹⁾ 立野 紘雄¹⁾
 佐藤 郁郎¹⁾ 山田 章吾²⁾

体腔液細胞診において、細胞集塊内の結合組織の存在が中皮細胞の同定に役立つと思われたので報告する。

対象は大腸癌症例の腹水 24 例。内訳は、細胞診陰性であった 16 例（術中採取 13 例，穿刺採取 3 例）と陽性の 8 例（術中採取 4 例，穿刺採取 4 例）である。形態的に中皮細胞と判定できる上皮様中皮細胞集塊 55 個と明らかな癌細胞集塊 87 個について、Papanicolaou 染色標本脱色後，銀染色を施行し細胞集塊内の線維性結合組織の有無を観察した。

中皮細胞集塊では，55 個中 37 個（67.3%）に線維性結合組織を認めた。術中採取に限らず穿刺採取でも高率に線維性結合組織を認めた。癌細胞集塊では，濃染のため判定不能な集塊が 32 個（36.8%）あったが，残りの集塊 55 個（63.2%）には，明らかな線維はみられなかった。また，いずれの集塊でも細胞集塊辺縁が黒く縁どりされたように染まるものが少数みられた。

癌細胞か中皮細胞か問題となるような異型細胞集塊の内部に線維性結合組織を認めるとき，中皮細胞である確率がきわめて高く，癌細胞との鑑別に応用できる所見と思われた。

Key words : Ascites—Silver stain—Mesothelial cells—Fiber connective tissue

I. はじめに

体腔液細胞診においては，Papanicolaou 染色

The availability of silver stain to distinguish mesothelial cells from adenocarcinoma cells in ascites

Kuniko KOMURO¹⁾, C.T., I.A.C., Hiroyoshi ONODERA¹⁾, M.D., Tetsutaro TAKEDA¹⁾, M.D., F.I.A.C., Makiko ONUMA¹⁾, C.T., C.M.I.A.C., Takatsugi MURATA¹⁾, C.T., I.A.C., Takashi MATSUDA¹⁾, M.D., Katsuhiro NAKAMURA¹⁾, M.D., Hiroo TATENO¹⁾, M.D., Ikuro SATO¹⁾, M.D., Shogo YAMADA²⁾, M.D.

¹⁾Miyagi Cancer Center

²⁾Department of Radiology, Tohoku University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎ 981-12 宮城県名取市愛島塩手字野田山 47 の 1 宮城県立がんセンター 小室邦子

平成 5 年 12 月 1 日受付

平成 6 年 4 月 22 日受理

(Pap. 染色) や May-Gruenwald・Giemsa 染色 (M・G・G 染色) 標本の細胞形態からだけでは，中皮細胞と癌細胞の鑑別の困難な場合がある。細胞同定のために免疫細胞化学的方法など種々の試みがなされている¹⁻⁷⁾。今回，われわれは，銀染色で染まる線維性結合組織に着目し，中皮細胞と癌細胞の鑑別におけるその有用性を検討したので報告する。

II. 対象と方法

対象は宮城県立がんセンターで，1984 年 1 月から 1992 年 12 月までの間に経験した大腸癌症例のうち，Pap. 染色標本上に上皮細胞と類似の中皮細胞の集塊を認めたもの，および癌細胞陽性であった 24 例の腹水である。この 24 例の腹水のうち細胞診が陽性であったのは 8 例で，手術中に採取したものが 4 例，腹腔

表 1 対象とした大腸癌症例の腹水細胞診

採取方法	細胞診	
	陽性	陰性
術中採取 17例	4	13
穿刺採取 7例	4	3

写真 1 印環細胞主体の低分化腺癌例の腹水に出現した中皮細胞集塊。集塊内に線維性結合組織を認める（術中採取、銀染色、対物100倍）

写真 3 集塊辺縁の一部濃染した縁取りを認める中皮細胞（術中採取、銀染色、対物100倍）

穿刺により採取したものが4例である。細胞診が陰性であったのは16例で、手術中に採取したものが13例、腹腔穿刺により採取したものが3例である（表1）。

これらの症例の標本において、細胞診で明らかに中皮細胞と診断できる集塊55個および、明らかに癌細胞と診断できる集塊87個について、銀染色で染まる細胞集塊内の線維性結合組織の有無を観察した。なお、銀染色は、AgNORsの観察が主目的とされる

表 2 中皮細胞集塊および癌細胞集塊における線維性結合組織の有無

集塊の細胞診断	線維性結合組織		
	集塊内にあり	なし	判定不能
中皮細胞集塊 (n=55)	37 (67.3%)	18 (32.7%)	0 (0%)
癌細胞集塊 (n=87)	0 (0%)	55 (63.2%)	32 (36.8%)

(χ^2 検定, $p < 0.005$)

写真 2 中皮細胞集塊。集塊中央から四方に広がる線維を認める（穿刺採取、銀染色、対物100倍）

AgNORs法を用いた。Pap.染色標本の形態を観察後脱色し蒸留水で水洗、コロイド銀液で室温60分、水洗後5%チオ硫酸ナトリウム溶液にて5分定着、流水水洗、脱水、透徹、封入した。

III. 結 果

観察の結果を表2に示した。細胞診で中皮細胞と診断した細胞集塊内に線維性結合組織を認めたのは、55個中37個(67.3%)であった(写真1, 2)。集塊内に線維性結合組織を認めなかった18個中3個では集塊辺縁の一部が黒く縁どりされて観察された(写真3)。

細胞診で癌細胞と診断した細胞集塊では濃く染まりすぎたり、あるいは重積が著明で線維性結合組織の存在の有無を判定できない集塊が87個中32個(36.8%)みられた。しかし、残りの集塊55個では、集塊内に線維性結合組織は認められなかった(写真4~6)。中皮細胞における頻度との間に有意差(χ^2 検定, $p < 0.005$)が認められた。

中皮細胞について採取方法別にみると、術中採取では32個中19個(59.4%)、穿刺採取では23個中18個(78.2%)に線維性結合組織が観察され(表3)、採

写真4 高分化腺癌例の腹水でみられた癌細胞集塊。重積が著しいが、微動ハンドルを動かして観察しても集塊中央に線維性結合組織は認めない（術中採取、銀染色、対物20倍）

写真5 中分化腺癌例の腹水にみられた癌細胞集塊。線維性結合組織は明らかでない（術中採取、銀染色、対物40倍）

取法の違いによる有意差はなかった。

なお、穿刺採取で線維性結合組織が観察された中皮細胞集塊18個は、すべて抗癌剤を腹腔内に投与していた症例で認められたものであった。

IV. 考 察

体腔液細胞診においては中皮細胞や食細胞と癌細胞との鑑別がしばしば問題となる。大腸癌の多くは分化度の高い腺癌であり、体腔液中に出現する高分化な癌細胞は、特に中皮細胞との鑑別に苦慮するところである。その鑑別のために免疫化学的検索などさまざまな試みがなされ報告¹⁻⁷⁾されている。

椎名ら⁷⁾は、CEA (carcinoembryonic antigen) 染色は腺癌細胞では73.3%で陽性であるのに対して中皮細胞ではCEAは全く検出されなかったことから、両者の鑑別に有効であるとしている。一方、松井ら⁶⁾

写真6 中分化腺癌例の腹水にみられた癌細胞集塊。線維性結合組織は認めない（術中採取、銀染色、対物100倍）

表3 採取方法別による中皮細胞集塊と線維性結合組織

採取方法	線維性結合組織	
	集塊内にあり	なし
術中採取 (n=32)	19 (59.4%)	13 (40.6%)
穿刺採取 (n=23)	18 (78.3%)	5 (21.7%)

(χ^2 検定, NS)

はCEAおよびBFP (basic fetoprotein) の二種類を用いることが両者の鑑別に有用であるとしているが、安井ら²⁾はCEAとEMA (epithelial membrane antigen) の組み合わせがよいとしている。

伊藤ら⁵⁾は細胞骨格蛋白と腫瘍マーカーを多数検討し、中皮細胞はkeratin, vimentinとCA 125に高率に陽性を示し、desmin, S-100蛋白, EMA, CEA, AFP (alpha-fetoprotein), CA 19-9 (carbohydrate antigen 19-9)に陰性であったと報告している。

難波⁴⁾は、EMAが癌細胞のマーカーとして優れており、LeuM3は組織球、マクロファージの検出に適しており、中皮細胞の検出にはCA 125が適当で、この三種類の染色を行うと鑑別は原則的に可能であるとしている。

広井ら³⁾は免疫細胞化学とレクチン結合性を検討し、反応性中皮細胞ではCEA, SucWGA (succinylated wheat germ agglutinin), RCA-1 (ricinus communis-1), HPA (helix pomatia)は全例陰性であり、腺癌細胞との鑑別に有用であるとしている。

また、伊藤ら¹⁾は中皮細胞とは反応しないといわれるモノクローナル抗体Ber-EP4を用いて、特に体腔液中の卵巢癌細胞と中皮細胞との鑑別に有用であると

している。

以上のように、中皮細胞と癌細胞の鑑別に関してはさまざまな染色方法が試みられているが、いずれの方法をもってしても完全に鑑別が可能というものではない。難波⁴⁾が指摘しているように、癌細胞は形態学的にほとんどの症例で十分な異型性を備えており、Pap. 染色や M・M・G 染色で 90% の症例が鑑別可能で、残りの症例において相補的に免疫化学染色などを実施すべきものであろう。

一方、銀染色を用いて、核内の silverbinding nucleolar organizer regions (AgNORs) を検討することにより良性、悪性の鑑別が可能であるとの報告がある。すなわち、NORs は rRNA 遺伝子を持った核内 DNA loop であり、その個数は細胞の活動性を反映するので悪性細胞では核内の AgNORs の個数の増加が報告⁸⁻¹²⁾されている。須甲¹³⁾らは、体腔液細胞診において AgNORs を検討し、核内 AgNORs の平均個数が 3 個以上のときに悪性である可能性が高いと報告している。

今回われわれは、銀染色の AgNORs 法を用いて NORs の観察中に、細胞集塊内の線維性結合組織と思われる部分が染色されていることに着目し、その有無を検討した。癌細胞集塊では判定不能例が 36.8% みられ、この判定不能例の中に結合組織を含んでいる集塊が全くないとはいいい切れず、今後検討を重ねる必要がある。しかし、われわれの今回の結果では癌細胞集塊に結合組織は認められなかったのに対して、中皮細胞集塊では 67.3% で観察された。このように中皮細胞が線維性結合組織を伴って体腔液中に出現することについては報告¹⁴⁻¹⁶⁾がみられる。佐々木¹⁴⁾は従来報告されていた“cell ball”が中皮細胞とその直下の線維性結合組織を含めたものであり、その機序は漿膜が手術操作によって分断されたために出現したものであるとしている。

われわれが中皮細胞の集塊内に確認した線維性結合組織についても、手術中に採取された検体については手術操作により中皮細胞がその直下の線維性結合組織も含めて分断され出現したのと考えられる。腹腔穿刺により採取した検体については穿刺針による漿膜の切断も考えられるが、これらの検体で線維性結合組織を含む中皮細胞集塊が認められたのは抗癌剤の腹腔内投与を実施されていた症例の腹水であることから、次のような理由も考えられる。すなわち、抗癌剤の腹腔内投与により漿膜組織が間葉細胞増殖型の反応¹⁷⁾（抗癌剤の

体腔内注入後 3~7 日の間に線維芽細胞様細胞がびまん性に増殖してくる反応）を示し、これが中皮細胞とともに剝離して出現したとする考えである。また、漿膜組織が広範囲に癌組織で置き換えられた場合、反応性の変化を起こし¹⁸⁾結合組織は中皮細胞とともに剝離脱落するとも考えられる。

癌細胞集塊内に結合組織を認めないことについては、腫瘍細胞が増殖する場合には間質系の組織を含まずに、癌細胞のみが分裂を繰り返して集塊を形成するのが癌の特徴であることから理解できよう。

なお集塊辺縁の一部の縁取りについては、標本作成過程のアーチファクト、細胞表面の surface coat を染めている可能性、基底膜なども考えられ、間質成分と特定することは困難であった。しかし、癌細胞の染色性とは異なることから、両者を鑑別するには有用な所見であると思われる。

V. ま と め

体腔液、特に手術中に採取された検体や抗癌剤の体腔内投与により治療されている症例の検体においては、中皮細胞か癌細胞かの判定が困難である場合には、銀染色により細胞集塊内の線維性結合組織の有無を観察することが、両者の鑑別に有用であると考えられた。

Summary

We studied the ability of silver staining to distinguish reactive mesothelial cell clusters from adenocarcinoma cell clusters in ascites. We silver stained cytological smears of ascites from 24 patients with colon cancer, sixteen of which were class II and eight of which were class V. We observed 55 cell clusters which were cytologically diagnosed as mesothelial cells and 87 cell clusters which were cytologically diagnosed as adenocarcinoma cells.

In 37 out of 55 (67.3%) cell clusters of mesothelial cells, clearly-defined silver-stained areas were observed in the center of the clusters. Although it was impossible to evaluate whether or not silver-stained areas existed in 32 out of 87 (36.8%) cell clusters of adenocarcinoma because of excessive staining, no silver-stained area was observed in the remainder (63.2%) of the adenocarcinoma cell clusters. In some adenocarcinoma cell clusters, linear silver-stained areas were observed along the peripheries of the clusters.

We consider the silver-stained area to consist of fibrous connective tissue.

In conclusion, silver staining can be used to differentiate between mesothelial cell clusters and adenocarcinoma cell clusters in ascites.

文 献

- 1) 伊藤 仁・他：モノクローナル抗体 Ber-EP 4 (“epithelial antigen”) の体腔液細胞診への応用, 日臨細胞誌, 31 : 599~603, 1992.
- 2) 安井 洋・他：酵素抗体法による体腔液中の癌および中皮細胞の鑑別, 日臨細胞誌, 30 : 1007~1012, 1991.
- 3) 広井慎之・他：反応性中皮, 悪性胸膜中皮腫および肺腺癌における複合糖質の細胞化学, 日臨細胞誌, 30 : 697~702, 1991.
- 4) 難波紘二：細胞診における免疫細胞化学の応用—とくに体腔液を中心として, 日臨細胞広島会報, 9 : 17~22, 1988.
- 5) 伊藤 仁・他：中皮細胞の免疫細胞化学的検討, 日臨細胞誌, 26 : 581~584, 1987.
- 6) 松井武寿・他：胸, 腹水細胞診への酵素抗体法の応用, 日臨細胞誌, 25 : 997~1002, 1986.
- 7) 椎名義雄・他：体腔液細胞診におけるCarcinoembryonic antigen (CEA) 検出の診断的意義, 日臨細胞誌, 25 : 37~44, 1986.
- 8) Egan, M., et al. : Evaluation of nucleolar organiser regions in pulmonary pathology, Thorax, 45 : 225~232, 1990.
- 9) Leong, AS-Y., et al. : Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanomas and melanotic naevi, Human Pathology, 20 : 257~262, 1989.
- 10) Ayres, J., et al. : Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organizer region associated proteins, Thorax, 43 : 366~370, 1988.
- 11) Crocker, J., et al. : Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus, Thorax, 42 : 972~975, 1987.
- 12) Crocker, J., et al. : Nucleolar organizer regions in lymphomas, Journal of pathology, 151 : 111~118, 1987.
- 13) 須甲憲明・他：体腔液細胞診における AgNORs の診断的意義, 日臨細胞誌, 30 : 1002~1006, 1991.
- 14) 佐々木政臣・他：術中腹腔洗浄液にみられる“cell balls”様細胞集塊の免疫細胞化学的検索, 日臨細胞誌, 31 : 931~936, 1992.
- 15) Schwinn, C.P., et al. : Culdocentesis, pp. 216~227, Tutorials of Cytology, Chicago, Illinois, 1990.
- 16) 山岸紀美江・他：肺癌と術中細胞診, 日本臨床病理学会, 特 87 : 151~163, 1990.
- 17) 海老原善郎・他：中皮組織の病理形態学—体腔の剝離細胞所見との関連について—, 日臨細胞誌, 24 : 1~12, 1985.
- 18) 矢谷隆一, 坂本穆彦：細胞診を学ぶ人のために, pp. 238~254, 医学書院, 1990.