原 著

乾燥塗抹標本の生食による再水和

——凍結保存の試みと酵素抗体法への応用——

京都市立病院臨床検査科¹⁾, 同 産婦人科²⁾, J.C.R.³⁾金岡 明博¹⁾ 三宅 秀一¹⁾ 川辺 民昭¹⁾ 黒木登美子¹⁾
金 榮治¹⁾ 小畑 義²⁾ 中山 啓三³⁾ 鷹巣 晃昌¹⁾

胸水・腹水の液状検体 10 例と各種摘出材料 10 例について次の 3 種類の標本を作製した。1) 塗抹後、ただちに 95% エタノールで固定した標本, 2) Chan らの方法に従い, 塗抹後冷風で 30 分間乾燥させ, 生理食塩水で 30 秒間再水和後, 95% エタノールで固定した標本, 3) 塗抹後風乾した標本を約 1 ヶ月間 -80°C で凍結保存した後に, 室温に戻し 2) と同様に再水和後固定した標本。これらの標本についてパパニコロウ染色を施行し, その細胞像を比較した。さらに体腔液 5 例の 1) と 3) の標本について 4 種類の抗体を用いて酵素抗体法を行った。パパニコロウ染色標本で 1) と 2) の標本を比較すると, 2) の標本に軽度ながら, 細胞が膨化する, 核網の染色性が低下し核内が明調に染色される, 細胞の立体的集団が平坦となるなどの傾向がみられたが両標本に大きな差異はなく, 鏡検に十分耐える染色性が得られた。3) の標本の細胞像も 2) とほぼ同様の所見であった。また, 1) と 3) の酵素抗体法の染色結果に差異はみられなかった。

これらの結果より, 未固定の乾燥塗抹標本を凍結保存した後に再水和する方法は, 後日のパパニコロウ染色や酵素抗体法などの染色のために細胞標本を保存する手段として有用と思われた。

Key words: Air-dried smear—Freeze-storing—Rehydration—Immunocytochemistry—Cytomorphology

I. はじめに

近年, 穿刺吸引細胞診が広く利用されるようになったが, 標本作製に際し乾燥の少ない湿潤固定標本を作

製することが困難な場合が少なくない。

そこで, Chan ら¹⁾は塗抹後一旦乾燥させた標本を生理食塩水 (NS) で再水和後に湿潤固定することによって, 安定した湿潤固定標本を作製する方法を試み, 有用であったと報告している。

われわれは, Chan らが報告した方法を追試し, 凍結保存した未固定の乾燥塗抹標本に対しても, この方法さらに酵素抗体法が応用できるか否かについて検討した。

II. 材料と方法

胸水 3 例 (肺腺癌 2, 反応性中皮 1), 腹水 7 例 (胃腺癌 1, 大腸腺癌 2, 卵巣腺癌 1, 悪性中皮腫 1, 反応性中皮 2) の塗抹標本とリンパ節 3 例 (転移性癌 1,

Rehydration of air-dried smears with normal saline—application to freeze-storing and immunocytochemistry—
Akihiro KANEOKA¹⁾, C.T., I.A.C., Shuichi MIYAKE¹⁾, C.T., I.A.C., Tamiaki KAWABE¹⁾, C.T., I.A.C., Tomiko KUROKI¹⁾, C.T., I.A.C., Yong-Chi KIM¹⁾, M.D., Tadashi OBATA²⁾, M.D., Keizo NAKAYAMA³⁾, C.T., I.A.C., Koshio TAKASU¹⁾, M.D.

¹⁾Department of Clinical Laboratory, ²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto City Hospital

³⁾J.C.R.

論文別刷請求先 ☎ 604 京都市中京区壬生東高田町 1 の 2
京都市立病院臨床検査科 金岡明博

平成 8 年 3 月 12 日受付

平成 8 年 6 月 14 日受理

反応性 2), 甲状腺 3 例 (乳頭癌 2, 濾胞癌 1), 肺 2 例 (腺癌), 子宮 2 例 (頸部扁平上皮癌) の摘出材料の捺印標本を用い, 各材料についてそれぞれ次の 3 種類の方法で標本を作製した。

1) 塗抹後, ただちに 95% エタノールで固定した標本 (CR 標本)。

2) Chan らの方法に従い塗抹後冷風で 30 分間乾燥させ, NS (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) で 30 秒間再水和した後, 95% エタノールで固定した標本 (RH 標本)。

3) 塗抹後風乾した標本を乾燥剤を入れた小型の標本箱に入れテープで密封し, 約 1 ヶ月間 -80°C で凍結保存した後に, 容器に入れたまま十分に室温に戻し, 2) と同様に再水和後固定した標本 (DF 標本)。

95% エタノールによる固定はいずれの方法でも 30 分から 1 晩行った。これら 3 種類の標本についてパパニコロウ (Pap.) 染色を行い, その細胞所見について比較検討した。

さらに胸水・腹水 5 例 (肺腺癌 1, 大腸腺癌 1, 胃腺癌 1, 悪性中皮腫 1, 反応性中皮 1) の CR 標本と DF 標本について, われわれが体腔液細胞診で主に中皮細胞と腺癌細胞の鑑別を目的として用いている carcinoembryonic antigen (CEA), epithelial membrane antigen (EMA), vimentin, keratin に対する streptavidin biotin (SAB) 法による酵素抗体法を実施した²⁾ (抗体はすべて DAKO 社製を使用)。内因性ペルオキシダーゼの阻害は 3% 過酸化水素水で 5 分行った。1 次抗体は CEA 200 倍, EMA 100 倍, vimentin 30 倍, keratin 300 倍に希釈して使用し, 反応は室温で 20 分行った。2 次抗体と酵素溶液の反応はそれぞれ室温で 10 分行った。酵素発色反応は, 0.005% 過酸化水素水加 3.3'-ジアミノベンチジン溶液を使用し, 核染色は 1% メチルグリーン核染色液で行った。

III. 結 果

Pap. 染色で RH 標本を CR 標本に比較すると RH 標本に軽度ながら次のような所見がみられた (写真 1, 2)。

細胞集塊：細胞が重積性を示す集塊 (体腔液の腺癌例や悪性中皮腫例, 肺の腺癌例や甲状腺の乳頭癌例) では, 細胞の立体的集団が平坦となる。

細胞質：子宮扁平上皮癌例やリンパ節の扁平上皮癌

転移例では腫瘍細胞の形態や細胞質の染色性にほとんど違いはみられなかった。その他の例では細胞の膨化と細胞質が薄く染色される傾向がみられた。

核：扁平上皮癌例では, 核の大きさや核網の染色性にほとんど差異はみられなかった。その他の例では核が膨化し, 核内が明調に染色され, 核小体や核縁が明瞭に認められた。

標本作製中の細胞の保持性：腫瘍細胞が少数であった大腸腺癌例や卵巢腺癌例の腹水 2 例に, RH 標本により多くの腫瘍細胞が認められた。しかし, その他の標本では特に差異は認めなかった。

RH 標本と DF 標本の Pap. 染色の細胞像の比較では, 細胞集塊, 細胞質, 核の染色性や標本作製中の細胞の保持性にも差異はみられず同様の所見であった (写真 1, 2)。

また, CR 標本と DF 標本の酵素抗体法の染色結果, 腺癌細胞は CEA, EMA, keratin 陽性, 中皮細胞および悪性中皮腫細胞は EMA, keratin, vimentin 陽性を示し, 各例の CR 標本と DF 標本の染色結果に差異はみられなかった (写真 3, 4)。

IV. 考 察

穿刺吸引細胞診材料は, 剝離細胞診材料に比較し, 穿刺物に含まれる液体あるいは粘液成分が少ない場合や穿刺物が少ない場合などに固定前の乾燥が起こりやすく, 良好な湿潤固定標本作製することが困難な場合が少なくない。

そこで, Chan ら¹⁾は塗抹乾燥後に再水和する方法について検討を行った。再水和液として流水, 低張食塩水, NS や 50% グリセリン水溶液を試み, NS が最も良好であったと述べている。また, その細胞所見について通常の湿潤固定標本に比べ, ① 核の染色性が優るとも劣らない, ② 細胞がやや膨化する, ③ 細胞の立体的集団が平坦となり一平面上で細胞の観察ができる, などの違いがみられたが, この方法が穿刺吸引細胞診の標本作製に十分適用できると報告している。

今回われわれは, Chan らの方法を追試した結果, RH 標本を CR 標本に比べると細胞所見に軽度の差異を認めたが, 鏡検に十分耐える標本作製できると判断された。

細胞診の標本作製に際し, 塗抹後乾燥させて再水和する試みには, 尿の標本作製中に起こる細胞剝離の防止を目的とした Solomon らの報告³⁾や, 簡便で乾燥

写真1 甲状腺乳頭癌の捺印標本。A：通常の湿潤固定標本，B：乾燥／再水和標本，C：乾燥／凍結／再水和標本。BをAに比べると細胞の膨化がみられ，核が明調に染色されている。BとCの細胞像はほぼ同様の所見である（Pap. 染色， $\times 20$ ）。

写真2 胸水，肺腺癌。A：通常の湿潤固定標本，B：乾燥／再水和標本，C：乾燥／凍結／再水和標本。BをAに比べると細胞の立体的集団が平坦となり，核内が明調に染色され核小体が明瞭にみられる。BとCの細胞像はほぼ同様の所見である（Pap. 染色， $\times 40$ ）。

の少ない標本作製を目的とした Bonime の報告⁴⁾などがある。再水和液として，それぞれラウリル硫酸ナトリウムや50%グリセリン水溶液を用いている。

また，Ng ら⁵⁾は Chan らの方法を尿と体腔液の標本作製に応用し検討した結果，通常の湿潤固定標本に比べ，細胞所見については核網の染色性の低下がみられたほかは Chan らの報告と同様であったとしている。さらに塗抹乾燥後に再水和する方法の長所として，特に血液成分の多い体腔液では NS による再水和

中に溶血が生じ，背景がきれいになり細胞の観察がしやすい，また尿では標本作製中の細胞剥離が少ないことなどを指摘している。われわれの検討では，体腔液の2例に RH 標本の方が CR 標本に比べ細胞保持性が良好であった例を認めたが，その他の標本では明らかな差異はみられなかった。

なお，乾燥した細胞標本が再水和によって湿潤固定した細胞標本に近い状態まで回復する機序は明らかではないが，Bonime⁴⁾は乾燥によって細胞の染色性が

写真 3 腹水，悪性中皮腫，A：通常の湿潤固定標本，B 乾燥／凍結／再水和標本，A と B ともに腫瘍細胞は Vimentin 陽性で染色結果に差異はみられない (Vimentin に対する SAB 法， $\times 40$)

低下する理由として，乾燥のために細胞表面が硬化し，固定液や染色液の浸透が妨げられると述べている．おそらく硬化した細胞表面が再水和によって軟化され固定液や染色液が浸透するものと推測される．

一方，細胞標本を保存して種々の染色を行う場合，最も繁用されている 95% エタノール固定標本はその保存期間に限度があり，また乾燥標本でも保存期間や染色法が限られるなど，パラフィン包埋による組織標本に比べ，困難なことが多い．

Chan ら¹⁾は，塗抹後の乾燥時間について 5 秒から 3 日間の間のさまざまな時間について検討し，30 分間が最も適当であったとしている．そして 1 日以上経過すると一部の細胞に自己融解がみられ満足すべき結果は得られなかったとしている．

われわれは，未固定の乾燥塗抹標本を凍結保存した後に，Chan らの方法を応用して湿潤固定ができるか否かを検討した．その結果，RH 標本と DF 標本間の Pap. 染色の細胞像にほとんど差異は認められず，さ

写真 4 腹水，悪性中皮腫，A：通常の湿潤固定標本，B：乾燥／凍結／再水和標本，A と B ともに腫瘍細胞は EMA 陽性で染色結果に差異はみられない (EMA に対する SAB 法， $\times 40$)

らに酵素抗体法にも応用できることがわかった．

未固定の乾燥塗抹標本の凍結保存については，蒲ら²⁾らがわれわれの方法と同様に未固定の乾燥塗抹標本を乾燥剤とともに容器に入れ， -18°C で約 1 ヶ月間保存した後に，リンパ球の表面抗原検出のための酵素抗体法を実施したところ，抗原性の劣化や形態の変化は特にみられなかったと報告している．なお，さらに長期間の凍結保存については検討中である．

凍結保存した乾燥塗抹標本を再水和後，湿潤固定ができるこの方法は，未固定細胞標本の長期保存の可能性と，染色法に応じて湿潤固定法や乾燥固定法が選択できるなどの利点を有し，未固定細胞標本を蓄積したり，後日に染色を実施する場合などの実用に耐えるものと思われる．

V. ま と め

1) 乾燥塗抹標本を NS により再水和後，湿潤固定する方法の追試と，凍結保存した乾燥塗抹標本にも，

この方法さらに酵素抗体法が応用可能か否かについて検討した。

2) CR標本とRH標本のPap.染色の結果では,細胞所見に若干の差異を認めたが鏡検には十分耐える染色性が得られた。

3) 凍結保存した未固定の乾燥塗抹標本に,この方法さらに酵素抗体法を応用することは可能と思われる。

本論文の要旨は第34回日本臨床細胞学会秋期大会学術集会(平成7年11月,東京)において発表した。

Summary

We reassessed the success of the rehydration technique in the original study, and investigated whether rehydration after frozen storage can enable long-term preservation of air-dried smears. We also attempted immunocytochemical staining of the smears.

Three similar smears were made from ten fluid specimens (pleural effusions and ascitic fluid) and ten surgically resected organs. The smears were processed as follows; by immediate wet fixing in 95% ethanol (A smears); by air-drying for 30 minutes, rehydrating in normal saline for 30 seconds, and then fixing in ethanol (B smears); and by air-drying, frozen storage at -80°C for a month, then warming to room temperature (C smears). The smears were subsequently rehydrated and fixed the same as B smears. We Papanicolaou stained these prepared smears and compared the cytologic findings. We also immunostained A and C smears using four commercial antibodies.

The cells in Papanicolaou-stained B smears showed slight cellular enlargement, decreased chromaticity of the chromatin net resulting in more distinct staining of the nu-

cleoli, and flatter cell clusters than in A smears. However, overall cytologic details were preserved well in the B smears and the staining quality of the A and B smear was not significantly different. Papanicolaou-stained C smears was comparable to the B smears.

The quality of immunostaining of the C smears was similar to that of the A smears.

We conclude that application of the rehydration technique to air-dried and frozen-stored unfixed smears is useful in the long-term preservation of cytologic specimens for subsequent Papanicolaou and immunocytochemical staining.

文 献

- 1) Chan, J.K.C., Kung, I.T.M. Rehydration of air-dried smears with normal saline, application in fine-needle aspiration cytologic examination. *Am. J. Clin. Pathol.* 1988; 89: 30~34.
- 2) 佐々木正道. 悪性中皮腫の病理. *病理と臨床* 1989; 7: 709~719.
- 3) Solomon, C., Silberblatt, J.M., Hyman, R.M. Comparison of dry smear technics with wet technics for the cytologic study of urine. *Am. J. Pathol.* 1957; 27: 601~605.
- 4) Bonime, R.G. Air-dried smear for cytologic studies. *Obstet. Gynecol.* 1966; 27: 783~790.
- 5) Ng, W.F., Choi, F.B., Cheung, L.L.H., Wu, C., Leung, C.F., Ng, C.S. Rehydration of air-dried smears with normal saline, application in fluid cytology. *Acta Cytol.* 1994; 38: 56~64.
- 6) 蒲 貞行, 鬼頭那吉, 鈴木亮而, 栗田宗次, 須知泰山. ギムザ染色で形態観察ができる, リンパ球表面抗原検出のための酵素抗体法について. *日臨細胞誌* 1989; 28: 1~10.