〈特集〉 細胞診へのフィードバックを旨とする新しい手法

体腔液細胞診材料におけるテロメラーゼ活性の検討

岐阜大学医学部第1病理¹⁾, 厚生連岐阜北総合病院病理²⁾, 同 内科³⁾

吉見 直己¹⁾ 井野 夏子¹⁾ 高橋 京子¹⁾ 戸島 敏²⁾

新井 正³⁾ 安田 洋³⁾ 田中 卓二¹⁾

テロメラーゼは細胞の老化や不死化に関わる重要な細胞内リボ核蛋白質である。近年、テロメラーゼ活性の測定が polymerase chain reaction 法を利用した簡便な方法で可能となった。今回、われわれは体腔液材料でのテロメラーゼ活性の測定とその有用性を調べるため、培養細胞でのテロメラーゼ活性の測定限界を検討するとともに、実際の58サンプル(42症例)の体腔液材料を用い、以下の結果を得た。

- 1) 大腸癌培養細胞 COLO 320 でのテロメラーゼ活性陽性の限界は20~50個であった。
- 2) 正常白血球との混合希釈液では、癌細胞の含有1%までに検出可能であった。
- 3) 58サンプル中17サンプルでテロメラーゼ陽性であった。細胞診判定を基準とする鋭敏度(sensitivity)は69%(9/13)であり、特異性(specificity)は87.5%(28/32)であった。
- 4) 悪性腫瘍症例29例の内、細胞診での陽性は11例で、テロメラーゼ活性の陽性は15例に認められた。細胞診・テロメラーゼ両者を併用すると21症例(72.4%)が陽性となり、陽性率が高まった。

以上、テロメラーゼ活性の測定は体腔液の細胞診標本作製後の残りでも可能であり、臨床病理学的診断の補助的利用に有用と考えられた。

Key words: Body cavity effusions—Telomerase—Cytology—Telometric repeat amplification protocol assay

I. はじめに

近年、染色体末端に存在するテロメアは細胞の寿命に関与するといわれ、染色体の安定化、しいては細胞機能維持に関与するとされている¹⁾。テロメラーゼはテロメアを合成する鋳型RNAをもった逆転写酵素であるが、最近、polymerase chain reaction (PCR)を利用した高感度のアッセイ系(telometric repeat amplification protocol (TRAP)法)が考案され、その活性の有無が腫瘍の悪性化に関係することが報告された²⁾。多くのヒト癌細胞において、テロメア長の短縮化が認められ、そうしたテロメアの短縮は細胞死につながる筈にもかかわらず、癌細胞が永久的に増殖

The cytological diagnosis and telomerase activity of cells in effusions of body cavities

Naoki YOSHIMI¹⁾, M.D., M.I.A.C., Natsuko INO¹⁾, M.D., Kyoko TAKAHASHI¹⁾, C.T., I.A.C., Satoshi TOSHIMA²⁾, C.T., I.A.C., Tadashi ARAI³⁾, M.D., Yo YASUDA³⁾, M.D., Takuji TANAKA¹⁾, M.D., F.I.A.C.

¹⁾Department of Pathology, Gifu University School of Medicine

²⁾Divisions of Pathology, ³⁾Internal Medicine, JA Gihoku General Hospital

論文別刷請求先 ☎ 500 岐阜市司町40 岐阜大学医学部第1病理 吉見直己

平成8年7月16日受付

平成8年9月6日受理

し得るのは、通常ヒト体細胞に発現していないテロメラーゼが活性化され、テロメラーゼ活性が短いながらも維持されて細胞が不死化に至ったためと理解される¹⁾。われわれは動物特にラットにおけるテロメラーゼ活性について観察してきたが²⁾、このテロメラーゼ活性出現を体腔液細胞診材料への応用性について、培養細胞を使った基礎的および実際の体腔液細胞診材料で検討した。

II. 対象と方法

1. 培養細胞での予備実験

培養細胞は大腸癌由来細胞 COLO 320 (p 53 点突然変異を有する) を用い、細胞数による希釈系列 (10000~10 個) を作成し、検出限界について検討した。また、健常人白血球に対し 1~10000 対 1 (50,

10, 1, 0.1 および 0.01%) の 5 段階の混合液を作成し、体腔液中の種々の混合した状態での影響を検討した。

2. 体腔液細胞診材料

実際の体腔液細胞診材料は、1995 年 7 月ほどから岐阜病院、一部は、国療岐阜病院および中濃病院で収集しえた体腔液材料 58 サンプルを用いた (表 1)。その内訳は胸水 33 サンプル、腹水 20 サンプル、心嚢液 4 サンプルおよび胆汁 1 サンプルである。これらを細胞診標本作製時に 2 枚のパパニコロウ染色作製後、残存するバフィーコート部の沈渣をタンパク抽出時まで -80°C にて保存した。細胞診判定は陰性・疑陽性・陽性の 3 段階で判定した。

なお、症例としては肺癌を中心に 42 症例 (悪性腫瘍例 29 例, 良性疾患 9 例および不明 4 例) について検討した (表 1)。不明例はいずれも組織病理学的検

表 1 検討サンプル別のまとめ

サンプル番号	症例番号	臨床・病理診断	体腔液の種類	細胞診判定	テロメラーゼ活性判定	サンプル番号	症例番号	臨床・病理診断	体腔液の種類	細胞診判定	テロメラーゼ活性判定
1	1	乳癌	胸水	+	+	30	23	心不全	胸水	-	-
2	〃	〃	胸水	+	+	31	24	慢性肝炎	胸水	-	-
3	2	肺癌	胸水	+	+	32	〃	〃	胸水	-	-
4	3	肺癌	胸水	+	+	33	25	肺炎	胸水	-	-
5	4	肺癌	胸水	+	+	34	26	卵巣癌	腹水	+	+
6	5	肺癌	胸水	?	-	35	27	胆嚢癌	腹水	+	+
7	〃	〃	胸水	+	+	36	28	脾癌・腹膜炎	腹水	+	-
8	6	肺癌	胸水	+	-	37	29	大腸癌	腹水	+	-
9	〃	〃	胸水	+	-	38	30	悪性中皮腫	腹水	?	-
10	7	肺癌	胸水	?	+	39	〃	〃	腹水	?	-
11	〃	〃	胸水	?	-	40	〃	〃	腹水	?	-
12	8	肺癌	胸水	?	+	41	31	胃癌	腹水	-	-
13	9	肺癌	胸水	?	+	42	〃	〃	腹水	-	-
14	10	肺癌疑・胸膜炎	胸水	?	+	43	〃	〃	腹水	-	-
15	11	肺癌・肺結核	胸水	?	-	44	32	大腸癌	腹水	-	-
16	12	心筋症・膠原病	胸水	?	-	45	33	肝癌	腹水	-	-
17	13	肺癌 (小細胞癌)	胸水	-	+	46	34	腹膜炎・イレウス	腹水	-	-
18	〃	〃	胸水	-	+	47	〃	〃	腹水	-	-
19	14	肺癌	胸水	-	+	48	〃	〃	腹水	-	-
20	15	肺癌	胸水	-	-	49	35	不明・肝腫瘍疑	腹水	-	-
21	〃	〃	胸水	-	-	50	36	肝硬変	腹水	-	-
22	16	肺癌	胸水	-	-	51	37	不明・肺癌疑	腹水	-	-
23	17	肺癌	胸水	-	-	52	〃	〃	腹水	-	-
24	18	肺癌	胸水	-	-	53	38	不明	腹水	-	-
25	〃	〃	胸水	-	-	54	39	肺癌	心嚢液	+	+
26	19	胃癌	胸水	-	-	55	40	肺癌	心嚢液	?	+
27	20	大腸癌	胸水	-	-	56	41	不明・心不全	心嚢液	?	-
28	21	イレウス・心不全	胸水	-	-	57	〃	〃	心嚢液	?	-
29	22	結核症	胸水	-	-	58	42	胆管炎	胆汁	-	-

+: 陽性, ? : 疑陽性, - : 陰性

索などで確定診断し得なかったものである。

3. テロメラーゼ活性の測定

テロメラーゼ活性の測定は基本的には Kim らの TRAP 法に従い²⁾, 上記 1 および 2 で保存しておいた細胞成分を, 20~100 μ l のバッファー液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5% CHAPS (Pierce Chemical Co.), 10% glycerol) にて氷上溶解し, 15000 $\times$ g, 4°C にて 30~40 分遠心後, 上澄み液を蛋白抽出液として保存した。上記の蛋白抽出液と TS プライマー (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') にてテロメアを人工的に作らせた後, CX プライマー (5'-(CCCTTA)₅CCCTAA-3') および [α -³²P] dCTP を加えて, 通常の PCR 法にて増幅させた。この PCR 産物は, 15% アクリルアミドゲルにて電気泳動後, オートラジオグラフィーにて確認した³⁾。陽性コントロールとして培養細胞 COLO 320 細胞を用い, 陰性症例に対しては COLO 320 細胞抽出液を加えて, TRAP 法の抑制物質の混入の有無を検討した。活性の判定は 40 bp くらいより約 100 bp 以上の範囲で梯子状にバンドがみられるものを, 基本的に 2 回以上の

繰り返し実験を行って, 陽性判定とした。

III. 結 果

1. 培養細胞での検出限界

培養細胞の希釈系列における検出限界は細胞数 20~50 個までは検出可能であり, 今回 10 個のものは検出できなかった (写真 1)。

また, 今回の培養細胞と正常白血球との混合液での TRAP 法の検出限界は 1% 癌細胞含有混合液までであった (写真 2)。

2. 体腔液材料での細胞診とテロメラーゼ活性の判定

サンプルごとの細胞診判定とテロメラーゼ活性判定は表 1 に示し, その比較をまとめたものが表 2 である。58 サンプル中 17 例 (約 30%) にテロメラーゼ活性を認めた。陰性・陽性判定一致率 (疑陽性例は除く) は 44 分の 37 で 84% であり, 細胞診判定を基準とした鋭敏度 (sensitivity) は 69% (9/13), 特異性 (specificity) は 87.5% (28/32) であった。また, 細胞診判定の疑陽性例 14 サンプル中 5 サンプル 35.7% がテロメラーゼ陽性であった。細胞診陰性でテロメ

写真 1 培養細胞 COLO 320, 細胞数での希釈系列における検出限界。レーン 1; DNA サイズマーカー, レーン 2; 10000 個, レーン 3; 10000 個と RNase 処理, レーン 4; 10000 個と熱処理, レーン 5; 1000 個, レーン 6; 500 個, レーン 7; 200 個, レーン 8; 100 個, レーン 9; 50 個, レーン 10; 20 個, レーン 11; 10 個

写真 2 健常人白血球と COLO 320 細胞の混合液での TRAP 法の検出限界。レーン 1 と 8; DNA サイズマーカー, レーン 2; 白血球のみ 10000 個, レーン 3~5; 白血球: COLO 320 の混合で, それぞれ 9990:10, 9900:100, 9000:1000, レーン 6; COLO 320 細胞のみ 10000 個, レーン 7; COLO 320 細胞 10000 個と RNase 処理

表 2 サンプル別の細胞診とテロメラーゼ判定の比較

	細胞診判定			計
	陰性	疑陽性	陽性	
テロメラーゼ活性・陰性	28	9	4	41
テロメラーゼ活性・陽性	3	5	9	17
計	31	14	13	58

表3 症例別の陽性判定症例数のまとめ

	症例数	細胞診 陽性数	テロメラー ゼ陽性数	併用での 陽性数
悪性腫瘍症例	29	11(17)*	15	21
良性疾患	9	0(1)	0	—
不明	4	0(1)	0	—
合計	42	11(19)	15	

*() は疑陽性例を含む症例数

ーゼ陽性はいずれも気管支生検にて診断されている肺癌症例であった。しかし、再検討しても胸水中に悪性細胞は確認できなかった。

表3には良・悪性症例別のまとめを示し、悪性腫瘍症例29例のうち、細胞診での陽性は11例で、テロメラーゼ活性の陽性は15例に認められた。細胞診・テロメラーゼ両者を併用する21症例(72.4%)が陽性となり、陽性率は高まった。なお、良性疾患での細胞診判定の疑陽性例(表1, サンプル番号16)は心筋症、膠原病での胸水であり、不明の疑陽性例(表1, サンプル番号56, 57)は92歳、女性の心嚢液で腺癌を疑ったが、全身の検索にも関わらず、悪性腫瘍は発見し得ていない。

IV. 考 察

TRAP法の限界に関しては、Kimらの論文²⁾の中では100個の癌細胞があれば検出可能としているが、今回のわれわれのデータは20~50個の細胞で検出可能であった。しかし、体腔液材料は癌細胞ばかりではなく、多くは反応中皮細胞や組織球および炎症細胞からなるため、正常リンパ球を含む混合液について検討したが、今回の結果はほぼ正常細胞100個に癌細胞1個、すなわち体腔液に含まれる細胞中、1%以上の癌細胞が必要であることを示し、実際の体腔液材料での応用には、今後より感度を高める検討が必要のようである。しかし、今回の結果では、実際の体腔液細胞診材料のテロメラーゼ活性の有無と同一材料の細胞診判定とほぼ一致性を認め、比較的良好な結果が得られた。加えて、担癌患者における細胞診陰性材料でテロメラーゼ陽性例が認められ、細胞診が材料の一部しか検討し得ないのに対し、テロメラーゼ活性の測定は体腔液含有細胞全体を反映する点で、細胞診との併用による病理診断補助の一つとしての有用性が示されたものと考えられた。

今回の検討で細胞診判定とテロメラーゼ活性の有無の不一致例について、若干の考察を加える。まず、細胞診陰性でテロメラーゼ陽性の例(表1, サンプル番号17, 18)は、小細胞癌肺癌であるが、リンパ球が多くに認められ、活性化リンパ球によるテロメラーゼ陽性とも考えられたが⁴⁾、非常に少数の小細胞癌細胞の混入は否定し得ないものとする。逆に、細胞診陽性でテロメラーゼ陰性の4例(表1, サンプル番号8, 9, 36, 37)に関しては、サンプルそのものが血性の強いものであり、こうした材料はTRAP assay上抑制物質特にTaqポリメラーゼ抑制物質が含まれるか、または多量の血液成分による蛋白により癌細胞由来の蛋白を測定感度以下に希釈されてしまった可能性がある。しかし、今回培養細胞と陰性例特に赤血球混合の強いサンプルからの抽出物において、培養細胞のテロメラーゼ活性の抑制は認めていないので、後者の可能性が高い。したがって血液成分の多い検体は一度遠心してバフィーコート部を採取してできるだけ、血液成分を特に赤血球成分を取ることが必要のようである。テロメラーゼ測定法は新しい手法であり、今後こうした不一致例の検討の積み重ねが重要である。

当初のKimら²⁾の報告では不死化細胞および悪性腫瘍細胞では98%以上がテロメラーゼ活性陽性を示すとされ、境界病変の悪性診断に病理組織診断以上の客観性が期待された。しかしながら、その後、種々の臓器における腫瘍のテロメラーゼ活性が検討・報告され^{5,6)}、Kimらがいうほどの高率な陽性率は認めておらず、臓器により違いはあるが、70~90%ほどにとどまっているようであり、事実、未発表ではあるが、われわれも脳腫瘍、大腸癌および乳癌で同程度の結果を得ている。現在のところ、大腸癌に比べ、大腸腺腫ではテロメラーゼ活性はほとんど認められていないようだが⁷⁾、しかし一方で、予後の良いとされる脳腫瘍の稀突起膠細胞腫や良性腫瘍の乳腺の線維腺腫においても陽性反応がみられており^{5,6)}、当初の期待のように汎用性の良・悪性の指標になるといいがたいようである。しかし、リンパ節転移率や病期などの患者の予後とは強い相関があるようであり⁶⁾、今後においても重要な予後因子の一つとは考えられる。

細胞診へのテロメラーゼ活性の応用は、Hiyamaら⁶⁾が乳腺腫瘍の穿刺材料を使って一部検討しているのみで詳細な検討はなされていない。今回の体腔液細胞診材料でのテロメラーゼ活性は反応性中皮細胞での症例では認めておらず、大量の体腔液材料の細胞診ス

クリーニングには有用ではないかと思われた。特に、全身の検索にも関わらず、悪性腫瘍は発見し得ていなかった心嚢液で腺癌を疑った疑陽性例（表1，サンプル番号56，57）は結局1年以上経った現在でも健在であり，結果的に反応性中皮細胞の可能性が高く，癌細胞との活動性中皮細胞の鑑別にも有用であると示唆したものと考えられた。未だ，症例数が乏しいため，対象症例を増やす必要があるが，このテロメラーゼ活性測定は昨今の分子生物学的手法の病理診断分野への応用のひとつとして，重要な方法と考えられる。特に今回は検討していないが，術中細胞診との併用はより感度の良い検索方法と考えている。

検体採取に対し，国療岐阜病院の可児泰正細胞検査士，浅井紀子・清水信幸検査技師また厚生連中濃病院の福井加代子細胞検査士，吉田 悟検査技師の協力を深謝いたします。

なお，本論文要旨は第37回日本臨床細胞学会総会（盛岡市，1996年5月）にてシンポジウムとして発表した。

Summary

Telomerase is a ribonucleoprotein that synthesizes telomeric DNA on chromosome ends, and may be related to the aging and immortality of cells. Recently, a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase activity, using the polymerase chain reaction, was developed. In this study, we examined the limitations of this TRAP assay by applying it to a cultured colon cancer cell line (COLO 320) and 58 human cytological materials from body cavity effusions, and obtained the following results.

- 1) The limits of the TRAP assay were 20~50 cells for the COLO 320 cell line.
- 2) One COLO 320 cell per 100 normal blood white cells was detectable.
- 3) Seventeen of 58 samples were positive for telomerase activity in this study. The sensitivity was 69% (9/13) and the specificity was 87.5% (28/32) between cytological diagnosis and telomerase activity.
- 4) Among 29 malignant cases, 15 were positive for

telomerase activity, while there were 11 cytologically positive cases. The positive cases detected by the combination of cytology and telomerase activity accounted for 21 of the total 29 cases (72.4%).

As mentioned above, these results suggest that the measurement of telomerase activity in body cavity effusions may be useful as an adjunctive tool for cytological and clinicopathological diagnosis and that this technique is potentially applicable to remnant cytological materials.

文 献

- 1) Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., Allshire, R.C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990 ; 346 : 866~868.
- 2) Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M.D., Ho, P.L.C., et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994 ; 266 : 2011~2015.
- 3) Yoshimi, N., Ino, N., Suzui, M., Hara, A., Nakatani, K., Sato, S., et al. Telomerase activity of normal tissues and neoplasms in rat colon carcinogenesis induced by methylazoxymethanol acetate and its difference from that of human colonic tissues. *Mol. Carcinogenesis* 1996 ; 16 : 1~5.
- 4) Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 1995 ; 155 : 3711~3715.
- 5) Langford, L.A., Piatyszek, M.A., Xu, R., Schold Jr, S. C., Shay, J.W. Telomerase activity in human brain tumours. *Lancet* 1995 ; 346 : 1267~1268.
- 6) Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokoyama, T., Gazdar, A.F., et al. Telomerase activity in breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996 ; 88 : 116~120.
- 7) Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H.W., Gallinger, S., Bacchetti, S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995 ; 55 : 2533~2536.