 原 著

体腔液細胞診における p 53 蛋白の免疫細胞化学的検討

山梨医科大学附属病院検査部¹⁾, 同 第2病理²⁾, 同 産婦人科³⁾,
順天堂大学病理学第1講座⁴⁾

中澤久美子¹⁾ 弓納持 勉¹⁾ 石井 喜雄¹⁾ 早川 直美¹⁾
加藤 良平²⁾ 池上 淳³⁾ 須田 耕一⁴⁾ 尾崎由基男¹⁾
久米 章司¹⁾

細胞診断が確定した132例の体腔液細胞診標本を用いて免疫細胞化学的にp 53蛋白の検出を試みた。悪性細胞陰性例では, class I, class IIの中皮細胞を対象とし, 20例中4例(20%)が陰性(-), 15例(75%)が10%以下の陽性(1+), 残りの1例(5%)が11%以上50%未満の陽性(2+)を示した。すなわち, ほとんどが1+であった。これらの中皮細胞のp 53蛋白の発現は遺伝子解析により変異型が認められず, 野生型の可能性が高いと考えられた。

悪性細胞陽性例におけるp 53の発現は112例中88例(78.6%)にみられ, その染色性は15例(13%)が1+, 40例(36%)が2+, 残りの33例(29%)が3+ (50%以上の陽性)であった。すなわち, 2+以上陽性が65%にみられた。このことより, 体腔液細胞診におけるp 53の免疫染色で, 陽性細胞が多数認められる症例では悪性の可能性が高いと考えられた。原発巣では肺癌89%, 子宮体癌88%, 肺小細胞癌75%, 肺腺癌70%などが特に高率であった。また, p 53の発現と原発巣および予後との関係では, 統計学上明らかな相関は見出せなかった。

Key words : p 53 protein—Effusion—Cytology

I. 目 的

近年, 癌の発生に遺伝子の異常が関与していること

が明らかになり, 各種癌関連遺伝子の解析が進みつつある¹⁻⁵⁾。癌関連遺伝子の中でもp 53癌抑制遺伝子の異常は, 各種悪性腫瘍に検出され腫瘍の発生に密接に関与していると考えられており²⁻⁵⁾, 細胞診の分野においてもこれらの癌関連遺伝子の応用がなされている⁶⁻⁹⁾。

体腔液細胞診では, 反応性中皮細胞や低異型性の悪性細胞は, しばしば良悪の判定に苦慮することを経験する。このようなとき, PAS染色などの粘液染色やCEAなどの免疫染色を施行し診断の補助としているが, これらの染色でも判定が困難なことがある。

そこで今回われわれは, 体腔液中の悪性細胞におけるp 53蛋白の発現について検討し細胞診断上の有用性について考察した。

Immunocytochemical study of p 53 protein expression in body cavity fluid cytology

Kumiko NAKAZAWA¹⁾, C.T., I.A.C., Tsutomu YUMI-NAMACHI¹⁾, C.T., I.A.C., Yoshio ISHII¹⁾, C.T., I.A.C., Naomi HAYAKAWA¹⁾, C.T., I.A.C., Ryohei KATOU²⁾, M.D., Atsushi IKEGAMI³⁾, M.D., Koichi SUDA⁴⁾, M.D., Yukio OZAKI¹⁾, M.D., Shoji KUME¹⁾, M.D.

¹⁾Clinical Laboratory, ²⁾Department of Pathology, ³⁾Department of Gynecology, Yamanashi Medical College

⁴⁾Department of Pathology, Juntendo University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎ 409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110 山梨医科大学附属病院検査部 中澤久美子

平成9年3月26日受付

平成9年6月13日受理

II. 材 料

対象は、山梨医科大学附属病院検査部に細胞診検査として提出され、細胞診断が確定した132例の体腔液とその関連材料である。内訳は悪性細胞陰性例が、class I, class IIの中皮細胞を対象とし、特にそれらが多数認められた20例である。悪性細胞陽性例は112例で胸水47例、胸腔洗浄液4例、腹水57例、および心嚢液4例で、その原発巣は胸水などでは肺腺癌、腹水では胃癌が最も多かった(表1)。

III. 方 法

細胞診断の確定した標本を、キシロールに浸しカバーガラスを取り除き免疫染色を行った。免疫染色は、LSAB法[DAKO社]で一次抗体に抗p53モノクローナル抗体(DO-7)[NOVO CASTRA社]を100倍、室温30分で用いた。陽性細胞の判定は山岸の方法⁷⁾に準じ、かつ斉藤ら¹⁰⁾の指摘する問題点も考慮して4段階とした。すなわち、対象細胞が全く染まらない陰性例を-、10%以下陽性例を1+、11%から50%を2+、51%以上を3+とした。

遺伝子解析は、目的とする細胞を顕微鏡下で約1~3×10²個採取し、PCR-SSCPの解析を行った⁹⁾(タカラバイオメディカルセンター)。

表1 悪性例における原発巣の内訳

胸水 (47例)		腹水 (57例)	
肺腺癌	22例	胃癌	19例
肺小細胞癌	4例	肝癌	9例
胃癌	2例	大腸癌	6例
卵巣癌	4例	卵巣癌	9例
胆管癌	2例	子宮体癌	6例
乳癌	2例	子宮頸癌	1例
甲状腺癌	1例	肝癌	3例
食道癌	2例	胆管癌	1例
多発性骨髄腫	2例	小腸腺癌	1例
悪性リンパ腫	1例	悪性リンパ腫	1例
悪性黒色腫	1例	原発不明腺癌	1例
肉腫	1例	心嚢液 (4例)	
原発不明癌	3例	肺腺癌	1例
胸腔洗浄液 (4例)		縦隔腫瘍	1例
肺腺癌	4例	子宮頸癌	1例
		原発不明癌	1例

IV. 結 果

良性細胞である中皮細胞では、20例中4例(20%)がp53染色-, 15例(75%)が1+, 残りの1例(5%)が2+であった(表2)。つまり中皮細胞は、ほとんどが1+のp53陽性像を示した(写真1)。

悪性細胞でのp53染色性は、112例中24例(21%)が-, 15例(13%)が1+, 40例(36%)が2+, 残りの33例(29%)が3+であった(表2)。すなわち、2+以上の陽性例が65%に認められた。

1. 原発巣・組織型別のp53染色性

肺腺癌は27例中2+の症例が13例(48%), 3+が6例(22%)にみられ、両者合わせ19例(70%)であった。肺小細胞癌は4例中3例(75%)が3+であった(表3)。胃癌は19例中2+が6例(32%), 3+が5例(26%)で両者合わせ11例(58%)であった。胃癌例のうち、低分化型が10例と過半数を占めていたが、特に分化度とp53染色性には明らかな相関はみられなかった(表4)。肝癌では9例中2+が3例、3+が5例みられ、両者合わせ8例(89%)であった。また、分化度別では低分化癌が3例中3例とも3+を示した(表4)。大腸癌では2+以上が6例中4例

表2 体腔液細胞診におけるp53の染色性

p53染色性	-	1+	2+	3+
中皮細胞 (20例)	4 (20%)	15 (75%)	1 (5%)	0
悪性細胞 (112例)	24 (21%)	15 (13%)	40 (36%)	33 (29%)

-; 陰性, 1+; ≤10%, 2+; 11~50%, 3+; ≥51%

写真1 胸水。一部の中皮細胞の核(2核とも、矢印)に陽性像を認める(p53免疫染色, ×100)

(67%), 卵巣癌では同様に2+以上が9例中5例(55%), 子宮体癌は6例中5例(88%)であった。子宮体癌では、低分化例でp53陽性が高い傾向であった(表5)。

2. p53の染色性と予後との関係

予後の追跡が可能であった症例について、原発巣別にp53の染色性との関係を検討した(表6, 7)。ここでの予後は、体腔液中に癌細胞が確認されてから死亡までの期間を現した。

表3 肺癌の体腔液細胞診におけるp53の染色性

p53 染色性	—	1+	2+	3+
肺 腺 癌 (27 例)	6 (22%)	2 (7%)	13 (48%)	6 (22%)
肺小細胞癌 (4 例)	1 (25%)	0	0	3 (75%)

—; 陰性, 1+; ≤10%, 2+; 11~50%, 3+; ≥51%

肺腺癌21例中18例が6ヵ月未満で死亡しそのp53の染色性は1+以下が6例で、2+以上が12例であった。残りの3例は6ヵ月以上の生存例で、いずれも2+の染色性であった。胃癌では、15例中10例が6ヵ月未満で死亡しており、p53の染色性は1+以上と2+以上の症例が5例ずつであった。残りの5例は6ヵ月以上生存し、その4例が2+以上の染色性であった。膵癌では6ヵ月以上生存が7例中1例で、3+であった。卵巣癌では1年未満の死亡例が6例中2例みられ、いずれも3+であった。また、1年以上の生存した4例では3例が1+以下であった。子宮体癌は1年以上の生存例が5例で、うち3例が2+以上の染色性であった。これらを統計学的に検討したが、p53の染色性と予後とに明らかな相関を見出せなかった。

3. 中皮細胞のp53遺伝子解析

p53陽性を示した中皮細胞の遺伝子解析において、PCRでエクソン5, 6, 7, 8の増幅を行うと5, 6, 8

表4 腹水中悪性細胞の原発巣・分化度・組織型別p53染色性(胃癌, 膵癌)

p53 染色性	—	1+	2+	3+
胃癌				
高 分 化 型 (1 型)	0	1	0	0
中 分 化 型 (4 型)	0	1	1	2
低 分 化 型 (10 例)	3	2	3	2
印環細胞型 (4 型)	1	0	2	1
合 計 (19 例)	4 (21%)	4 (21%)	6 (32%)	5 (26%)
膵癌				
高 分 化 型 (2 例)	0	0	1	1
中 分 化 型 (4 例)	0	1	2	1
低 分 化 型 (3 例)	0	0	0	3
合 計 (9 例)	0	1 (11%)	3 (33%)	5 (56%)

—; 陰性, 1+; ≤10%, 2+; 11~50%, 3+; ≥51%

表5 腹水中悪性細胞の原発巣・分化度・組織型別p53染色性(大腸癌, 卵巣癌, 子宮体癌)

p53 染色性	—	1+	2+	3+	合計
大腸癌	低分化腺癌	1	0	0	2
	粘液癌	0	1	3	4
	合計	1 (17%)	1 (17%)	3 (50%)	6
卵巣癌	漿液性嚢胞腺癌	1	0	0	2
	漿液性乳頭状腺癌	2	1	1	7
	合計	3 (30%)	1 (11%)	1 (11%)	9
子宮体癌	高分化腺癌	0	0	1	1
	中分化腺癌	0	1	1	5
	合計	0	1 (17%)	2 (33%)	6

—陰性, 1+; ≤10%, 2+; 11~50%, 3+; ≥51%

表 6 p 53 染色性からみた予後 (肺腺癌, 胃癌, 膀胱癌)

p 53 染色性	—	1+	2+	3+	合計
肺腺癌 (21 例)					
6 ヶ月未満	5 (28%)	1 (6%)	7 (39%)	5 (28%)	18
6 ヶ月以上	0	0	3 (66%)	0	3
胃癌 (15 例)					
6 ヶ月未満	3 (33%)	2 (20%)	3 (30%)	2 (20%)	10
6 ヶ月以上	0	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	5
膀胱癌 (7 例)					
6 ヶ月未満	0	1 (17%)	3 (50%)	2 (33%)	6
6 ヶ月以上	0	0	0	1 (100%)	1

—; 陰性, 1+; ≤10%, 2+; 11~50%, 3+; ≥51%

表 7 p 53 染色性からみた予後 (卵巣癌, 子宮体癌)

p 53 染色性	—	1+	2+	3+	合計
卵巣癌 (6 例)					
1 年未満	0	0	0	2 (100%)	2
1 年以上	1 (25%)	2 (50%)	0	1 (25%)	4
子宮体癌 (5 例)					
1 年未満	0	0	0	1 (100%)	1
1 年以上	0	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	4

—; 陰性, 1+; ≤10%, 2+11~50%, 3+; ≥51%

写真 2 中皮細胞における exon 8 の SSCP 解析サンプル
S に明らかな変異のバンドは認められない

が増幅され, SSCP 解析では変異が確認されなかった (写真 2)。さらに, シークスエンス解析も行ったが同様に変異が確認されなかった。

V. 考 察

今回われわれは, 多くの悪性腫瘍で検出される p 53 蛋白の免疫染色を体腔液細胞診に応用した。その結果, 悪性細胞 112 例中 73 例 (65%) が 2+以上の陽性を示した。これは, p 53 遺伝子の異常が全癌の 50% の頻度でみられるといわれる²⁾のに対し高率であった。しかも原発巣別では, 膀胱癌が 9 例中 8 例

(89%), 子宮体癌が 6 例中 5 例 (88%), 肺小細胞癌が 4 例中 3 例 (75%), 肺腺癌が 27 例中 19 例 (70%), 大腸癌では 6 例中 4 例 (67%) が 2+以上の陽性を示し, 多くの原発巣で非常に高率であった。これは, 対象が細胞診材料であるため固定保存状態が非常に優れていること, また体腔液に出現した悪性細胞ということで高悪性度のものが対象であったためと考えられる。

p 53 の染色性と予後との関係では, 肺癌や乳癌での報告が多くみられ, 一般には有意な予後因子としての解釈が多い^{8,10~12)}。今回の検討では肺癌, 胃癌, 膀胱癌, 子宮体癌および卵巣癌では, 両者の間に統計学上明らかな有意差はみられなかった。これは, 体腔液細胞診陽性という末期癌のため差が出なかったのではないかと考えられた。しかし, 卵巣癌において症例数は少ないが, p 53 陽性細胞が 3+以上で予後が悪い傾向が認められ, 今後さらに症例を重ね検討する必要があると思われる。

中皮細胞への p 53 蛋白の発現は, 悪性中皮腫の鑑別に应用されているが^{13,14)}, 活動性中皮細胞での報告は少ない¹⁵⁾。今回検討で, 中皮細胞にも 20 例中 15 例 (75%) が 1+の陽性を示し, 1 例 (5%) が 2+の陽性を示した。この中皮細胞の p 53 遺伝子解析を試み

た。しかし、用意した細胞数が解析に必要な $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個に比べ少数であったためか、エクソン 7 は 3rdPCR でも増幅されず、エクソン 5, 6 および 8 において SSCP 解析、シーケンスを行った。その結果、変異は確認されず野生型の可能性が高いと考えられた。今回免疫細胞化学に使用した p 53 (DO 7) の抗体は、野生、変異型の両方に反応するので、野生型が活動性中皮細胞に反応したと考えられる。一般的に、変異 p 53 蛋白は半減期が正常 (野生型) に比べ 4~20 倍であるため免疫細胞化学的に認められるのは半減期が長い変異 p 53 蛋白と考えられている⁷⁾。しかし、一種の培養液状態である体腔液における細胞診では、保存固定条件が非常に優れているため、今回の結果のように野生型も検出することがあると考えられる。これは、今まで p 53 蛋白の発現細胞は、すべて悪性の可能性が高いと考えられたが、必ずしもそうとはいえないことが示された。

体腔液細胞診は、胸腹膜から組織材料が得られ難いので、その診断が患者の治療や予後を推定する上で非常に重要である。近年分子生物学の進歩にともない、癌の発生・進展に遺伝子の異常が深く関わっていることが明らかになり、いくつかの遺伝子の発現で診断率を向上させる試みもなされている⁹⁾。今後 p 53 などの遺伝子蛋白の検出が診断困難例の細胞診断のみならず、予後の推定にも役立つと考えられる。

Summary

Immunocytochemical staining for p 53 was evaluated in 132 cases of effusion. In mesothelial cells of patients without malignancy, p 53 protein was not detected in 4 out of 20 patients (20%). In 15 patients (75%), less than 10% of the cells examined were positive for p 53 (1+). One patient (5%) was strongly positive for p 53 (2+, 11~50%). Gene analysis revealed that the expression of p 53 on these mesothelial cells was of a wild type. p 53 expression in malignant cells was detected in 88 of 112 patients (78.6%). In 15 patients, the number of positive cells was less than 10% (1+). Forty of the 112 patients (36%) had positive cells ranging from 11 to 50% (2+). In 33 patients (29%), the rate of positive cells was higher than 51% (3+). That p 53 expression with over 2+ staining was detected in 65% of the malignant cells suggests that immunocytochemical staining for p 53 in effusion is useful for cytological diagnosis. In terms of origin, pancreas carcinoma (89%), endometrial

adenocarcinoma (88%), small cell carcinoma of the lung (75%), and adenocarcinoma of the lung (70%) had an especially high rate of p 53 expression. There appears to be no correlation between the rate of p 53 expression and prognosis.

文 献

- 1) Monica, H., David, S., Bert, V., Curtis C.H. p 53 mutation in human cancers. *Science* 1991; 253: 49~53.
- 2) Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. Mutations in the p 53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 4855~4878.
- 3) 秋山 徹. 細胞増殖制御に関する核内癌増殖遺伝子, 癌抑制遺伝子の最前線. 東京: 羊土社, 1995: 26~41.
- 4) 横田 淳. 癌抑制遺伝子研究の推移, 癌抑制遺伝子の最前線. 東京: 羊土社, 1995: 10~24.
- 5) 河野隆志, 横田 淳. 癌の発生・進展にかかわる癌抑制遺伝子, 癌抑制遺伝子の最前線. 東京: 羊土社, 1995: 127~137.
- 6) 藤原登美子, 斉藤昌広, 藤田 彬, 渡辺精子, 伊藤智, 渡辺 斉・ほか・細胞診標本からの PCR 法 (DNA 増幅) ならびに直接塩基配列決定一肺小細胞癌での p 53 癌抑制遺伝子変異の検出. *日臨細胞秋田会誌* 1995; 1: 27~32.
- 7) 山岸紀美江. 癌抑制遺伝子と細胞診—尿細胞診における p 53 発現—. *臨床病理* 1994; 特 94: 38~49.
- 8) Stephenson, T.J., Royds, J.A., Silcocks, P.B., Brammer, H.J., Shorthouse, A.J., Undervood, J.C. Diagnostic association of p 53 immunostaining in fine needle aspiration cytology of the breast. *Cytopathol.* 1994; 5: 146~153.
- 9) EL-Habashi, A., EL-Morsi, B., Freeman, S.M., EL-Didi, M., Marrogi, A.J. Tumor oncogenic expression in malignant effusion as a possible method to enhance cytologic diagnostic sensitivity. *Am. J.C. Pathol.*, 1995; 103: 206~214.
- 10) 斉藤昌宏, 高橋さつき, 上坂佳敬, 榎本克彦. ヒト肺癌における癌抑制遺伝子 p 53 の変異解析. *日本臨床* 1996; 54: 497~502.
- 11) 入江康司, 石田博徳, 古川次男, 小柳孝太郎, 宮本祐一. 肺癌の臨床病理学的検討—特に p 53 および bcl-2 蛋白発現と予後—. *臨床病理* 1996; 44: 32~41.
- 12) Bozzetti, C., Nizzoli, R., Manotti, L., Savoldi, L., Camisa, R., Guazzi, A., et al. G. Fine-needle aspiration technique for the concurrent immunocytochemical evaluation of multiple biologic parameters

- in primary breast carcinoma, *Breast Cancer Res. & Treat.* 1994 ; 32 : 221~228.
- 13) Ramael, M., Lemmens, G., Eerdekens, C., Buysse, C., Deblier, I., Jacobs, W., et al. Immunoreactivity for p 53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium, *J. Pathol.* 1992 ; 168 : 371~375.
- 14) Mayall, F.G., Goddard, H., Gibbs, A.R. p 53 immunostaining in the distinction between benign and malignant mesothelial proliferations using formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 1992 ; 168 : 377~381.
- 15) Dowell, S., Derias, N., Wilson, P.O., Lane, D.P., Hall, P.A. Expression of p 53 in reactive mesothelium. *Histopathology* 1993 ; 22 : 96~97.
-