原 著

悪性中皮腫症例の体腔液に出現した hump 様細胞質突起を有する鑄型細胞の検討

公立昭和病院病理科

濱川 真治 森 一磨 柏崎 好美 田辺 美絵
近藤 洋一 坂牧久仁子 清水誠一郎

目的：悪性中皮腫症例の体腔液に出現した細胞のうち hump 様細胞質突起を有する鑄型細胞に注目し、その形態学的特徴と細胞生物学的意義について検討した。

方法：上皮型悪性中皮腫 4 例の細胞診材料を用い、腫瘍細胞の形態学的特徴を観察した。さらに、免疫染色および電子顕微鏡的検討も行った。

成績：体腔液中に出現した上皮様中皮細胞は、複数の細胞が互いに密着する像、細胞質および核の鑄型形成像、hump 様細胞質突起を有する鑄型細胞、いわゆる相互封入像、または数個の細胞からなる鑄型細胞集塊像などを示した。これらの所見は細胞集塊形成に至る過程と推察された。これらの細胞は、免疫染色にてカルレチニン、CK5/6、WT1、EMA が陽性であった。電顕的には hump 様細胞質突起部には細長い microvilli がみられ、核周囲には CK5/6 陽性像に一致すると考えられる特徴的な中間径フィラメントの集簇を認めた。

結論：上皮型悪性中皮腫の細胞診断において、hump 様突起を有する鑄型細胞には形態学的特徴があり、加えてこの鑄型細胞は細胞集塊形成の過程であると推察された。

Key words : Malignant mesothelioma — Effusion cytology — Morphology — Electron microscopy — Immunocytochemistry

I. はじめに

悪性中皮腫は比較的なめな腫瘍であり、体腔液を用

いた細胞診断では腺癌細胞や反応性中皮細胞との鑑別がしばしば問題となる。免疫染色^{1,2)}や電子顕微鏡的検索³⁾、その他の手法⁴⁾がこれらの鑑別診断に有用といわれているが、パパニコロウ染色標本（以下 Pap 標本）による細胞形態学的特徴^{5,6)}だけでは、確定診断に至る症例は少ないのが現状である。

今回われわれは、悪性中皮腫の体腔液細胞診標本中に出現した hump（コブ）様細胞質突起を有する鑄型細胞の形態学的特徴について検討し、興味ある所見を得たので報告する。

II. 対象および方法

1990 年から 2001 年 6 月までに公立昭和病院におい

Molded mesothelial cells with hump-like cytoplasmic process in effusion cytology of malignant mesothelioma

Shinji HAMAKAWA, C.T., I.A.C., Kazuma MORI, C.T., I.A.C., Yoshimi KASHIWAZAKI, C.T., I.A.C., Mie TANABE, C.T., I.A.C., Youichi KONDO, C.T., I.A.C., Kuniko SAKAMAKI, C.T., I.A.C., Seiichiro SHIMIZU, M.D.

Department of Pathology, Showa General Hospital

論文別刷請求先 〒187-8510 東京都小平市天神町2の450 公立昭和病院病理科 濱川真治

平成 14 年 6 月 12 日受付

平成 14 年 11 月 9 日受理

て悪性中皮腫と組織診断された6例のうち、体腔液中に上皮様中皮腫細胞が出現した4例を用いた。症例はすべて男性(57, 70, 71, 34歳)で、3例が胸水、1例(34歳の症例)は腹水であった。4例中2例に石棉曝露の既往を認めた。また、体腔液中のヒアルロン酸値は、4例中3例で高値を示した(平均188, 100ng/ml)。細胞材料はシラン塗布スライドガラス(New silane, 武藤化学)に塗布、95%エタノールで湿固定後、Pap染色およびPAS染色、アルシアングリーン染色、コロイド鉄染色を行い、風乾後の標本にてライトギムザ染色を行った。2例で行った免疫染色については、畠山ら⁷⁾の報告に従い、Pap染色などの既染色標本を用いて、マリノール(武藤化学)封入剤による細胞転写法およびダコペン(DAKO社)による標本分割法を行った。使用した一次抗体には、抗サイトケラチン抗体(AE1+AE3, DAKO社)、抗サイトケラチン5/6抗体(D5/16 B4, DAKO社)、抗カルレチニン抗体(Zymed社)、抗WT1抗体(6F-H2/DAKO社)、抗EMA抗体(E29, DAKO社)、抗CEA抗体(DAKO社)、抗ビメンチン抗体(V9, DAKO社)、抗Ki-67抗原抗体(MIB-1, MBL社)、抗p53抗体(DO-7, Novocastra社)を用いた。染色システムにはChem Mate ENVISION(DAKO社)を使用し、DAB(DAKO社)にて発色させ、ギル・ヘマトキシリンV(武藤化学)にて核染色を行った。また組織診断には、生検および手術摘出材料を用いて型のごとくHE染色標本作製し観察した。1例で行った電子顕微鏡観察に用いたセルブロックの作製法は、胸水検体を1,500 rpmで5分間の遠心分離を行い、上清排出後、沈渣に2%グルタルアルデヒドを重層し、4℃で一晩固定した。固化した沈渣を細切し、リン酸緩衝液にて洗浄後1%四酸化オスミウムにて後固定、上昇エタノールによる脱水、型どおりのエポキシ樹脂包埋を行い、透過型電子顕微鏡(日本電子JEM1200EXII, 高圧80kV)にて観察した。

III. 結 果

胸水Pap染色に認められた腫瘍細胞は比較的小型で、主として散在性あるいは小集塊状に出現していた。核は中心性で、小型の核小体がやや目立つものの核形不整に乏しく、細胞質はライトグリーン好染性で、重厚性がみられた。そのなかに、主として2個の細胞からなるいわゆる相互封入像が多数認められ、な

Photo. 1 Well differentiated malignant mesothelioma cells appearing with occasional molded cells and mutually including cells (so-called pair cells, arrow) with hump-like cytoplasmic processes (arrow) in body cavity fluid. (Pap stain, $\times 40$).

かでもライトグリーン好染性のhump様細胞質突起を有する鑄型細胞(molded cell with hump-like cytoplasmic process, 以下MCH)が多数観察された(Photo. 1)。鑄型細胞にみられたその他の所見として、細胞相互の並列密着像(cell-to-cell apposition)(Photo. 2a)、細胞質重積像(Photo. 2b)、核と細胞質の重積像(Photo. 2c)が観察された。MCHについては、侵入細胞によって核は半円状もしくは三日月状に押しやられた偏在性を示し、細胞質は侵入細胞を取り囲む像として観察された(Photo. 2d)。ライトギムザ染色では細胞質が好塩基性を呈し、hump様細胞質突起がより明瞭に観察することができ、hump様突起辺縁はアルシアングリーンおよびコロイド鉄染色にて一部陽性を示した。いわゆるpair cell(Photo. 2e)や1つの細胞に2個の細胞が同時に侵入する像も観察された(Photo. 3)。さらには、数個の細胞が寄り集まった鑄型細胞集塊像(Photo. 4)も認められ、pair cellの中には核崩壊像も極少数認められた。腹水細胞診材料には、MCHを中心とした一連の細胞形態の出現は少数で、多細胞性集塊が主体であった。また、摘出腫瘍組織の剖面擦過細胞材料には、このような細胞形態は観察されなかった。

電子顕微鏡的観察においては、Pap標本で細胞相互の並列密着像として観察された2つの腫瘍細胞は、細胞質の極一部が他方に侵入する像として観察された(Photo. 5a)。細胞質がさらに鑄型状に侵入した像が、光顕でみられた細胞質の重積像に相当すると考えられた(Photo. 5b)。また、核と細胞質の重積と考えられ

Photo. 2a Cell-to-cell apposition of mesothelioma cells (Pap stain, $\times 100$).

- b** The molded area of 2 mesothelioma cells widens and the cell boundary is clear (Pap stain, $\times 100$).
- c** Molded mesothelioma cells with overlapping nuclei and cytoplasm (Pap stain, $\times 100$).
- d** Typical molded mesothelioma cells showing the hump-like cytoplasmic process (Pap stain, $\times 100$).
- e** So-called pair cells are observed infrequently (Pap stain, $\times 100$).

Photo. 3 Two mesothelioma cells are included in 1 mesothelioma cell (Pap stain, $\times 100$).

Photo. 4 Several mesothelioma cells are observed as a molded cell cluster (Pap stain, $\times 100$).

Photo. 5a Electron microscopic findings corresponding to Photo. 2a, including a small part of the cytoplasm (bar = 2 μ m).
b Electron microscopic findings corresponding to Photo. 2b, including a large part of the cytoplasm (bar = 2 μ m).
c Electron microscopic findings corresponding to Photo. 2c observed as nuclear inclusion (bar = 2 μ m).
d The hump-like process consists of mesothelioma cell cytoplasm left in the outside. Intermediate filament aggregate surrounding the nucleus and long thin microvilli on the surface are typical (bar = 2 μ m).
e A mesothelioma cell is completely included in another mesothelioma cell (so-called pair cells) (bar = 2 μ m).

た細胞は、侵入する細胞の核にくびれを伴った鋳型細胞として観察された (Photo. 5c). MCHにおける侵入細胞は、他方の細胞の細胞質によってくびれを生じ、外部に取り残された細胞質がhump様に突出する像として観察された (Photo. 5d). また一方の細胞に完全に封入されたいわゆる pair cell 像も少数観察された (Photo. 5e). hump 様細胞質突起の表面には細長

い microvilli を認め、細胞質にはグリコーゲンやライソソーム、核および細胞膜近傍に中間径フィラメントの集簇を認めた (Photo. 6). 腫瘍細胞が鋳型状に寄り集まった多細胞性集塊も観察された (Photo. 7).

免疫染色においてこれらの細胞は、CEA, ビメンチンが陰性、サイトケラチン (AE1+AE3), サイトケラチン 5/6, カルレチニンに細胞質に陽性所見を示

Photo. 6 Long thin microvilli and perinuclear aggregate of intermediate filaments of hump-like protruded cytoplasm (bar = 2 μ m).

Photo. 7 A cell cluster with hump-like cytoplasmic process (bar = 2 μ m).

Photo. 8 Immunocytochemically, molded cells with the hump-like cytoplasmic process show strong positivity for cytokeratin 5/6 in the perinuclear and peripheral area of the cytoplasm (cytokeratin 5/6 stain, $\times 100$).

Photo. 9 Histologically, molded cells with the hump-like cytoplasmic process are seen infrequently in desquamated surface papilliform proliferation, but not seen in the deep solid portion (H-E stain, $\times 40$).

し、WT1は核に陽性を示した。さらにEMAは、ほとんどの中皮細胞の細胞膜に強陽性を示した。特にサイトケラチン 5/6は細胞質に強陽性を示し、核周囲および細胞辺縁に強く染まる傾向があった (Photo. 8)。Ki-67およびp53の陽性率は低く、侵入細胞と取込み細胞に差はなかった。組織診標本においては、充実性増殖部にMCHの所見は観察されず、乳頭状増殖部最表層の剥離傾向にある部位に極少数認められるのみであった (Photo. 9)。

IV. 考 察

悪性中皮腫は石綿暴露との関連が深く、患者数は今

後増加すると予想されている⁸⁾。悪性中皮腫の初期症状の一つに体腔液貯溜があり、本腫瘍の早期発見における体腔液細胞診の意義は大きい。しかし、通常の細胞診材料での確診率は低く^{9,10)}、決して有効な診断手段とはなりえていないのが現状と思われる。体腔液中に出現する悪性中皮腫細胞の多くは小型で、出現パターンは比較的単調であり、細胞異型も軽度であると言われており¹¹⁾、反応性中皮細胞との鑑別に苦慮する症例が多く、スクリーニングの段階で見落とされている可能性もある。

今回われわれは、悪性中皮腫を示唆する細胞形態を捕えるため、当院にて経験した上皮型悪性中皮腫4例に対し、retrospectiveに細胞形態学的検討を試みた。今回検討した4例はPap標本では組織球やリンパ球を

Table 1 Morphological process of molding

背景に、やや小型の中皮細胞が比較的多数出現していた。細胞質はライトグリーン好染性で重厚感があり、散在性に出現した細胞の核は中心性であった。核小体は小型で目立つものの、核形不整や核の大小不同に乏しく、反応性中皮もしくは腺癌細胞との鑑別に苦慮した症例で、細胞診材料にて悪性中皮腫の確定診断には至らなかった。腫瘍細胞の中には、2つの細胞からなるいわゆる相互封入像が多く観察され、hump (コブ) 様細胞質突起を持つ鑄型細胞が特徴的であった。さらに詳細な観察では、細胞の密着像 (cell-to-cell apposition), 細胞質の一部が重積する像、核や細胞全体が侵入する相互封入像、鑄型多細胞性集塊像も認めた。これらの細胞は、免疫染色にてカルレチニン、サイトケラチン5/6, WT1, EMA 陽性を示し、上皮型悪性中皮細胞と考えられた。セルブロックを用いた電顕的観察においては、細胞相互の密着像をはじめ、Pap 標本で細胞質や核の重積として観察された細胞像は、実際には細胞質や核の鑄型侵入像であった。また、MCH 形成については、まず細胞の侵入によって鑄型状となり、侵入した細胞の細胞質にくびれが生じ、外部に取り残された細胞質が hump 様に突出されたものと考えられた。Hump 様に突出した細胞質表面には細く長い microvilli が観察された。細胞質内の核周囲には中間径フィラメントの集簇を認め、サイトケラチン5/6の陽性像とほぼ一致していた。

上皮型悪性中皮腫の細胞形態学的特徴に関する報告は多い。亀井ら⁶⁾は2核以上の細胞が多く、ときに5~10核の多核細胞も出現することを特徴の1つにあげている。また、城崎ら¹²⁾や斎藤ら¹³⁾の報告にある軸対象性2核細胞の出現、さらに亀井ら¹⁴⁾の言う cell-to-cell apposition や相互封入像の出現も特徴的である。川口ら¹⁵⁾も上皮型の悪性中皮腫の特徴的所見として相互封入像をあげている。また、岩井ら¹⁶⁾はラットを用いた反応性中皮細胞の経時的出現様式に関する実験で、Carrageenan 投与後1日目では中皮細胞

は散在性に出現し、投与後3日目では cell-to-cell apposition や pair cell の出現、7日目には重積性のある細胞集塊を形成したとしている。これらの細胞像は、われわれが注目した一連の細胞形態像と同様と考えられ、悪性・反応性を問わず、刺激を受けた中皮細胞の形態学的特徴と思われる。

今回注目した MCH を中心とする一連の細胞像は、組織標本の腫瘍充実部では観察されず、乳頭状病変部の最表層に少数認められたことから、腫瘍細胞が体腔液中へ剥離した後もしくは剥離段階にある細胞に起こる現象と考えられた。また乳管癌における上皮細胞の相互封入像は、分裂異常の一つともいわれている¹⁷⁾が、今回の検討ではこのような証拠は得られなかった。MCH を中心とする一連の細胞の形成機序あるいは形成過程については、細胞が密着するために何らかの接着因子が働き¹⁸⁾、中皮細胞が持つといわれている貪食能¹⁹⁾や細胞侵入能などによって、MCH を経て相互封入像や細胞集塊形成に関与しているものと推察された (Table 1)。さらに、MCH を中心とした一連の細胞形態とともに、免疫染色によるサイトケラチン5/6の陽性所見が興味を引いた。抗サイトケラチン5/6抗体は高分子量のケラチンを認識し、Ordonez によって上皮型悪性中皮腫と肺腺癌細胞との鑑別に有効であるとして報告され²⁰⁾、カルレチニンや WT1 などとともに中皮細胞の同定に用いられている。さらに移行上皮癌細胞や腺上皮の基底細胞、肺や子宮の扁平上皮化生部や扁平上皮癌にも比較的高率に陽性となり、皮膚や乳腺組織にはサイトケラチン5が発現することが知られている²¹⁾。また、移行上皮癌における pair cell の出現²²⁾、増殖の著しい乳管上皮における相互封入像¹⁹⁾、さらに扁平上皮癌の癌真珠形成過程における cannibalism は、今回みられた鑄型細胞と同様の細胞形態像と思われる。今回検討した悪性中皮腫細胞と同様に、移行上皮癌や扁平上皮癌も抗サイトケラチン5/6陽性かつ相互封入像を示すことより、中皮細胞は扁平上皮・移行上皮に近似した細胞と思われた。

V. ま と め

悪性中皮腫の体腔液に出現する hump 様細胞質突起を有する鑄型中皮細胞を中心とした一連の細胞像は、細胞集塊形成に関わる連続的過程を示していると推察され、その細胞生物学的意義を考えさせられた。また、これらの細胞像は、体腔液の細胞診断において上

皮型悪性中皮腫を疑う上で有用な指標の一つになりうると考えられる。今後、さらに症例を蓄積し、出現パターンや出現頻度、反応性中皮細胞との形態学的相違についても検討を重ねる予定である。

稿を終えるにあたり、ご協力を賜りました当院呼吸器科・感染症科医長鈴木道明先生、同科部長松岡緑郎先生に深謝致します。

本論文の要旨は第1回中皮腫細胞診セミナー(2001年6月、浜松)および第25回日本気管支学会総会(2002年5月、札幌)にて発表した。

Abstract

Objective : We reexamined archive effusion cytology of malignant mesothelioma to study typical molded cells with hump-like cytoplasmic processes.

Study design : Using effusion material from 4 patients with epithelial malignant mesothelioma, we conducted the usual cytological examination, and electron microscopic and immunocytochemical examinations.

Results : Malignant mesothelioma cells appeared in the following morphology, in a conceivably on going process ; 1) single cells, 2) cell-to-cell apposition, 3) molded cells with hump-like cytoplasmic processes, 4) so-called pair cells, and 5) molded cell clusters. In these cells, immunocytochemistry was positive for calretinin, cytokeratin 5/6, WT1 and, EMA, and electron microscopy showed long thin microvilli and aggregates of intermediate filaments surrounding nuclei.

Conclusion : Typical molded cells with hump-like cytoplasmic processes are a diagnostic clue in effusion cytology for malignant mesothelioma and appear to be a stage in a conceivably on going process in which single mesothelioma cells mutually adhered, finally forming a small cell cluster.

文 献

- Lozano, M.D., Panizo, A., Toledo, G.R., Sola, J.J., Pardo-Mindan, J. Immunocytochemistry in the differential diagnosis of serous effusion. *Cancer Cytopathol* 2001 ; 93 : 68 ~ 72.
- Riera, J.R., Astengo-Osuna, C., Longmate, J.A., Battifora, H. The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma : A reevaluation after heat-induced epitope retrieval. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997 ; 21 : 1409 ~ 1419.
- Sakuma, N., Kamei, T., Ishihara, T. Ultrastructure of pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma in malignant effusions as compared with reactive mesothelial cells. *Acta Cytol.* 1999 ; 43 : 777 ~ 785.
- 岡村 宏, 洪田秀美, 光野彩子, 亀井敏昭, 佐久間暢夫, 石原得博・ほか. 体腔液中の腺癌, 悪性中皮腫, 反応性中皮の細胞鑑別における AgNORs 染色の有用性の検討. *日臨細胞誌* 2000 ; 39 : 445 ~ 452.
- 佐久間暢夫, 亀井敏昭, 洪田秀美, 岡村 宏, 権藤俊一, 石原得博. 胸水中に出現する悪性中皮細胞と肺腺癌細胞の鑑別. 画像解析装置を用いて. *日臨細胞誌* 1996 ; 35 : 93 ~ 98.
- 亀井敏昭, 洪田秀美, 岡村 宏, 光野彩子, 佐久間暢夫, 山下吉美・ほか. 体腔液細胞診における細胞鑑別. 一反応中皮, 中皮腫および腺癌の鑑別を中心に. *Medical Technology* 2001 ; 28 : 61 ~ 68.
- 畠山重春. 検体処理と標本作製 5. 固定・染色・封入法の新しい試み. *臨床検査* 2000 ; 44 : 1259 ~ 1263.
- 神山宣彦. 石綿の鉱物学と曝露の機会および肺内の石綿. 佐々木正道, 北川正信. 石綿汚染と疾患. 病理と臨床 東京 : 文光堂 ; 1989 : 676 ~ 685.
- Brenner, J., Sordillo, P. P., Magill, G. B. & Golbey, R. B. Malignant mesothelioma of the pleura. Review of 123 patients. *Cancer* 1982 ; 49 : 2431 ~ 2435.
- 日高利昭, 石井芳樹, 北村 諭. びまん性悪性中皮腫の臨床的検討. *日本胸部臨床* 1998 ; 57 : 737 ~ 741.
- 海老原善郎. 体腔液の細胞診. 病理と臨床 1989 ; 7 : 145 ~ 157.
- 城崎俊典, 有吉啓子, 石堂 統, 伊藤以知郎, 城所龍一, 小林 真・ほか. 上皮型腹膜悪性中皮腫の1例. *日臨細胞誌* 1993 ; 32 : 814.
- 斎藤 誠, 池田徳彦, 奥仲哲弥, 古川欣哉, 平野 隆, 小中千守・ほか. 悪性中皮腫細胞の腫瘍直接穿刺細胞像の検討—胸水細胞像との違いおよび肺腺癌との鑑別—. *日臨細胞誌* 1997 ; 36 : 219.
- 亀井敏昭, 洪田秀美, 平作洋子, 青木啓子, 山下吉美, 佐藤正和・ほか. 悪性中皮腫症例の腫瘍細胞の細胞像と電顕所見の特徴について. *日臨細胞誌* 1993 ; 32 : 815.
- 川口洋子, 菅沼麗桜, 笹瀬隆司, 吳地 剛, 菊地浩司, 井上 泰. 反応性中皮細胞との鑑別が困難であった腹膜原発悪性中皮腫の一例. *日臨細胞誌* 2000 ; 39 : 474.
- 岩井重寿, 佐藤房枝, 洪田秀美, 亀井敏昭. 漿膜の損傷・治癒過程における反応性中皮細胞の出現様式—ラットを用いた実験的研究—. *日臨細胞誌* 2000 ; 39 : 68 ~ 75.
- 土屋真一. 乳腺細胞診. 東京 : 医療科学社, 2000.
- 藤田美樹, 塚本健一, 佐藤真実, 加藤亜紀, 久保志津子, 三上晴克・ほか. Mesothelioma における腫瘍マーカーおよび接着因子. *日臨細胞誌* 1995 ; 34 : 352.
- 海老原善郎, 福島範子, 朝隅容子. 中皮組織の病理形態学—体腔の剥離細胞所見との関連について—. *日臨細胞誌* 1985 ; 24 : 1 ~ 12.
- Ordóñez, N.G. Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1998 ; 22 : 1215 ~ 1221.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L. The catalog of human cytokeratin : Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982 ; 31 : 11 ~ 24.
- 金城 満, 副島朋子, 渡辺寿美子, 濱野克彦, 鷺山和幸. 尿中細胞診における“Pair cell”の細胞学的および臨床的意義. *日臨細胞誌* 1999 ; 38 : 129 ~ 135.