症 例

術中迅速診断に細胞診および免疫染色が有用であった
膠芽腫（肥胖細胞型）の1例日本医科大学付属多摩永山病院病理部¹⁾，同 脳神経外科²⁾，同 第二病理学教室³⁾片山 博徳¹⁾ 前田昭太郎¹⁾ 細根 勝¹⁾ 原 博¹⁾山王 直子²⁾ 志村 俊郎²⁾ 横山 宗伯³⁾ 内藤 善哉³⁾

背景：脳腫瘍の迅速組織診断では，凍結による artifact のために診断に難渋することが少なくなく，細胞診の併用が有用である．今回，術中迅速診断に細胞診と迅速免疫染色が有用であった膠芽腫（肥胖細胞型）の1例を経験したので報告する．

症例：50 歳，女性，左側頭部に強い頭痛を認めたがそのまま放置した．同部位に頭痛が持続し，1 ヶ月後に当院脳神経外科を受診した．MRI にて左前頭葉に 3×2 cm の腫瘍性病変を認め，腫瘍摘出術が施行された．術中圧搾細胞診では円形～類円形のライト緑好性の細胞質および偏在性の異型核からなる N/C 比大の異型細胞が主体の腫瘍であった．

組織所見でも凍結による artifact がみられたが，基本的に細胞診と同様の腫瘍細胞がみられた．第一に膠芽腫（肥胖細胞型）が考えられたが転移性腺癌，悪性リンパ腫との鑑別のために迅速免疫染色（所用時間約 10 分）を行った．GFAP（+），keratin（-），LCA（-）であり膠芽腫（肥胖細胞型）と診断した．

結論：膠芽腫（肥胖細胞型）の術中迅速診断に圧搾細胞診および免疫染色が有用であった．

Key words : Glioblastoma (gemistocytic type) — Crush cytology — Intraoperative rapid diagnosis — Immunohistochemistry — Case report

I. はじめに

脳腫瘍ではその種類により治療方針が異なり¹⁾，術中迅速診断は術式変更など重要な役割を担うことになる．この迅速組織診断では，凍結による artifact により診断に難渋することが多く，細胞診の併用が有用である²⁻⁶⁾．今回，術中迅速診断に細胞診と免疫染色の併用が有用であった膠芽腫（肥胖細胞型）の1例を経験したので報告する．

II. 症 例

症 例：50 歳，女性．

A case of glioblastoma (gemistocytic type) — Immunostaining efficacy in intraoperative diagnosis —

Hironori KATAYAMA¹⁾, C.T., I.A.C., Shotaro MAEDA¹⁾, M.D., Masaru HOSONE¹⁾, M.D., Hiroshi HARA¹⁾, M.D., Naoko SANNO²⁾, M.D., Toshiro SHIMURA²⁾, M.D., Munehiro YOKOYAMA³⁾, M.D., Zenya NAITO³⁾, M.D.

¹⁾Department of Pathology, ²⁾ Department of Neurosurgery, Tama-Nagayama Hospital, Nippon Medical School

³⁾Department of Pathology, Nippon Medical School

論文別刷請求先 〒206-8512 東京都多摩市永山1の7の1 日本医科大学付属多摩永山病院病理部 片山博徳

平成 16 年 3 月 23 日受付

平成 16 年 7 月 1 日受理

主 訴：左側頭部の頭痛。

既往歴：10年前に子宮内膜症の手術を受けた。

家族歴：特記すべきものなし。

現病歴：1996年6月に左側頭部に強い頭痛を認めたが放置していた。同部位に頭痛が持続したため1ヵ月後、精査治療目的にて当院脳神経外科に入院した。入院時血液検査では特記すべき異常所見はみられなかった。CT (Photo. 1) MRIにて左前頭葉に3×2 cmの腫瘍性病変を認め、T1強調像にて低信号域、内部に嚢胞変化を認めた。術前に臨床・病理症例検討を行いグリオーマ、転移性癌、悪性リンパ腫の鑑別を主目的とした術中迅速診断が行われることとなった。なお、術後に放射線療法・化学療法を行ったが、術後2ヵ月に再発を認め、術後9ヵ月に肺炎を併発し呼吸不全のため永眠された。

III. 術中迅速診断

圧挫細胞所見：手術材料からの圧挫細胞診では大部分が偏在性の核を有する、円形～類円形の異型細胞で、N/C比が高く細胞質はライト緑好染であった。明

瞭な核小体をみる異型細胞も散見され、核分裂像も認めた (Photo. 2a)。背景に内皮細胞が増殖した細胞密度の高い血管も認めた。

凍結組織所見：凍結による artifact がみられたが細胞診と同様に核偏在性の異型腫瘍細胞の増殖がみられ、細胞密度も高かった (Photo. 2b)。ごく一部に巣状の壊死巣の形成も認めた。

細胞、組織所見から肥胖細胞型の膠芽腫を第1に考えたが転移性腺癌、悪性リンパ腫なども鑑別が必要な所見であり、迅速免疫染色を行った。

迅速免疫染色：抗 GFAP 抗体、抗 keratin 抗体、抗 LCA 抗体を使用し (Table 1)、1次抗体を3分、検出系はLSABキット (DAKO社) を使用し2次抗体、酵素標識試薬はそれぞれ2分反応させ、Fig. 1のごとく行い、約10分で結果を得ることができた。腫瘍細胞に対してGFAPが陽性であったが (Photo. 3a)、keratin, LCAは陰性であった (Table 2)。以上の結果より肥胖細胞型の膠芽腫と術中迅速診断した。

Table 1 Antibodies used for immunohistochemical staining

Antigen	Dilution		Clone	Source
	Rapid * 1	Regular * 2		
GFAP	1 : 20	1 : 100	Polyclonal	DAKO, Tokyo, Japan
Pancytokeratin	1 : 20	1 : 100	MNF116	DAKO, Tokyo, Japan
LCA	1 : 20	1 : 100	2B11 + PD7/26	DAKO, Tokyo, Japan

GFAP : glial fibrillary acidic protein, LCA : leukocyte common antigen

*1 : Dilution for intraoperative specimens, * 2 : Dilution for permanent

1. Fixation
 - 1) Cytological samples ; 95% ethanol, 1 minute.
 - 2) Frozen sections ; mixture of formalin (90 ml) and 100% ethanol (10 ml), acetic acid (5 ml), 1 minute.
2. After fixation, rinse gently with distilled water from a wash bottle.
3. Rinse gently with TBS * from a wash bottle.
4. **Apply primary antibody for 2 to 3 minutes.**
5. Rinse gently with TBS from a wash bottle.
6. **Apply biotinylated antibody for 2 to 3 minutes.**
7. Rinse slides as Step 3.
8. **Apply streptavidin-HRP for 2 to 3 minutes.**
9. Rinse slides as before.
10. **Color-develop with diaminobenzidine for 1 to 2 minutes.**
12. Rinse gently with distilled water and counterstaining with hematoxylin.
13. **Mount and judge, following dehydration and remounting.**

TBS * : Tris-Hcl Buffer saline

Fig. 1 Rapid immunostaining for intraoperative diagnosis

Table 2 Results of immunohistochemical staining

	Rapid specimens IHS *	Permanent specimens IHS *
GFAP	+	+
Pancytokeratin	—	—
LCA	—	—

HIS * : immunohistochemical staining

Photo. 1 CT showing a tumor mass at the left frontal lobe.

Photo. 3 Tumor cells were positive for GFAP ($\times 40$).
a : cytological sample, b : frozen section.

IV. 術後の組織所見

組織学的には、広汎に壊死に陥った腫瘍で核が偏在し、好酸性の細胞質を有する肥胖細胞型の腫瘍細胞が密に増生し、核分裂像もみられ細胞異型も高度であった。さらに壊死を取り囲んで核の偽柵状配列もみられ、内皮細胞の増生した血管増生も著しく、免疫染色では GFAP が陽性であったのに対して keratin, LCA は陰性であり、肥胖細胞型の膠芽腫と確定診断した (Photo. 4)。

Photo. 2 a : Large number of atypical tumor cells with round to oval nuclei and with abundant cytoplasm (Papanicolaou stain $\times 40$).
b : Atypical tumor cells with abundant eosinophilic cytoplasm (HE stain $\times 40$, frozen section).

Photo. 4 Tissue sections showing gemistocytic atypical tumor cells (a : HE stain $\times 40$). Tumor necrosis and pseudopalisading of nuclei (b : HE stain $\times 20$). Glomeruloid formation of vessels (c : HE stain $\times 20$).

V. 考 察

脳腫瘍における迅速組織診断は提出される組織が小さく、軟らかく水分の多い実質性で、凍結による arti-

factにより診断に苦慮することが少なくない。一方、細胞診はartifactが少なく簡便、迅速に標本作製が可能であり、その併用がきわめて有用であることが報告されている²⁻⁶⁾。本症例でも細胞診標本のほうが凍結組織と比較して核異型、核分裂像などの細胞個々の所見はより詳細に観察できた。術中迅速診断で本例は膠芽腫（肥胖細胞型）を推定したが、偏在核とライト緑に好染する細胞質からなる肥胖細胞型の異型細胞が優位にみられるなどその所見から鑑別診断として膠芽腫（肥胖細胞型）、転移性腺癌、悪性リンパ腫などを考えた。脳腫瘍は転移性腫瘍が多いことが特徴であり転移性脳腫瘍は脳原発悪性腫瘍の約3倍に及び、肥胖細胞型の異型細胞は低分化腺癌との鑑別に注意が必要である⁶⁾。

また、鑑別が難しい中枢神経系腫瘍の一つとして膠芽腫と転移性癌、悪性リンパ腫をあげている報告もある⁷⁾。このように今回の症例には鑑別診断を含め、術中迅速診断であるがゆえに慎重な判定が必要と考え、的確な診断をするために迅速免疫染色を行った。当院病理部では必要に応じて迅速診断に免疫染色を併用している⁸⁾。迅速診断のためにマイクロウエーブなどを用いた迅速免疫染色が報告されているが⁹⁾、今回用いた迅速染色法は特別な装置を使用することなくSAB法を用いたにもかかわらず、約10分で判定ができ十分迅速診断に用いることが可能であった。また、当施設では脳腫瘍の迅速診断に際して術前に必ず臨床とカンファレンスを行っており、抗体の準備など免疫染色の施行に際して慌てることなく対応できる要因と考えられる。われわれは迅速免疫染色の染色時間をより短縮するために現在は内因性ペルオキシダーゼの阻止と正常血清による非特異反応のブロッキングを省略しているがこれまで判定に不都合は生じていない。これは抗体、試薬の反応時間が通常行う免疫染色より短いためであると考えられる。

本症例のごとく脳腫瘍の術中迅速診断で、より短時間で的確な診断をするためには細胞診を併用し、なおかつ必要に応じて迅速免疫染色を用いることの有用性を強調したい。

Abstract

Background : Cytology is useful in the intraoperative diagnosis of brain tumors because it is sometimes difficult to diagnose

brain tumors correctly by HE stained frozen sections alone due to the presence of frozen artifacts.

We report a case of gemistocytic glioblastoma in which intraoperative rapid cytology and immunostaining were effective.

Case : A 50-year-old woman with a bad headache in the left temporal area was found in CT to have a 3×2 cm tumor in the left frontal lobe. Craniotomy and rapid intraoperative diagnosis were done.

Cytologically, numerous round and oval tumor cells with a high N/C ratio were observed with cyanophilic cytoplasm and eccentrically located atypical nuclei. Histologically, findings were basically the same as cytological findings. Gemistocytic glioblastoma was considered most likely, but metastatic adenocarcinoma and lymphoma could not be ruled out.

A 10-minute rapid immunostaining done for differential diagnosis confirmed glioblastoma because GFAP was positive but keratin and LCA were negative for tumor cells.

Conclusion : A combination of cytology and immunostaining is useful for rapid intraoperative diagnosis of gemistocytic glioblastoma.

文 献

- 1) 梶田泰一, 吉田 純. 脳腫瘍の集学的治療. 癌の臨床 1999; 45: 853~859.
- 2) 前田昭太郎, 細根 勝, 片山博徳, 内藤善哉. 脳腫瘍の術中迅速細胞診. Medical Technology 2003; 31: 320~324.
- 3) Savargaonkar, P., Farmer, P.M. Utility of intra-operative consultations for the diagnosis of central system lesions. Annals of Clinical & Laboratory Science 2001; 31: 133~139.
- 4) 小林省二. 脳腫瘍の細胞診—その限界と新しい可能性一. 日臨細胞誌 1997; 36: 636~645.
- 5) 工藤玄恵. 中枢神経系の術中迅速診断. 病理と臨床 2001; 19: 21~26.
- 6) 前田昭太郎, 浅野伍朗. 転移性腫瘍. 病理と臨床 1996; 14: 1041~1050.
- 7) 藤井雅彦, 丹野正隆, 早川欽哉. 中枢神経系の細胞診. 癌の臨床 1996; 42: 1068~1074.
- 8) 片山博徳, 前田昭太郎, 細根 勝, 山本英希, 松島申治, 横山宗伯・ほか. 肺・縦隔腫瘍の術中迅速診断に対する細胞診および免疫染色の応用. 日本病理学会会誌 2003; 92: 275.
- 9) 森 吉臣. マイクロウエーブを用いた迅速免疫染色. 免疫組織・細胞化学検査. 東京: 医学書院, 1995; 39: 136.