原 著

ポドプラニン免疫染色を用いた体腔液中の 反応性中皮細胞と腺癌の鑑別

阿部 和子¹⁾ 高島 且統¹⁾ 五十嵐 司²⁾ 大友 圭子²⁾

木村 伯子¹⁾

東北労災病院検査科¹⁾, 同 産婦人科²⁾

Key words : Body cavity effusion—Mesothelial cell—Adenocarcinoma—Immunocytochemistry—Podoplanin

目的 : 悪性中皮腫の組織診断に高い特異性と感度をもつポドプラニンが, 体腔液中の反応性中皮細胞や悪性中皮腫, および腺癌の鑑別に有用であるか検討を行った。

方法 : 体腔液に腫瘍細胞が出現している肺癌 10 例, 乳癌 10 例, 胃癌 10 例, 卵巣癌 5 例の計 35 例と悪性中皮腫 3 例, および反応性中皮細胞が出現している非癌症例 30 例にポドプラニンに対する特異抗体を用いて免疫染色を行った。

成績 : ポドプラニンはすべての非癌症例の中皮細胞に陽性で, 特に反応性中皮細胞がより強く陽性を示した。癌症例では 35 例中 33 例 (94%) が陰性だったが, 2 例の卵巣明細胞腺癌で腫瘍細胞の一部が弱陽性を示した。悪性中皮腫では 3 例すべてが陽性を示した。

結論 : ポドプラニンは反応性中皮細胞と悪性中皮腫で陽性を示すが, 大部分の腺癌では陰性でそれらの鑑別に有用である。しかし卵巣の明細胞腺癌が一部, 陽性を示すことを念頭におく必要がある。ポドプラニンによる反応性中皮細胞と悪性中皮腫の鑑別は困難であった。

I. はじめに

ポドプラニンは腎臓の糸球体の臓側上皮細胞 podocyte に特異的な膜蛋白¹⁾であるが, ポドプラニンに対するモ

ノクロナール抗体はリンパ管内皮細胞に特異的なマーカーとして用いられている²⁾。最近われわれは, ポドプラニンが中皮細胞や悪性中皮腫に特異的に発現することを組織標本で明らかにした³⁾。今回われわれは, ポドプラニンの免疫染色が体腔液細胞診における反応性中皮細胞と悪性中皮腫および腺癌との鑑別診断に有用か否か検討を行ったので報告する。

II. 対象と方法

1. 対象

反応性および癌性胸・腹膜炎の体腔液を対象とした。症例は組織診断にて原発巣が確定している肺癌 10 例 (腺癌 8 例, 小細胞癌 2 例), 乳癌 10 例, 胃癌 10 例, 卵巣癌 5 例の計 35 例と悪性中皮腫 3 例, および反応性中皮細胞が出現している非癌症例 30 例である。癌症例と悪性中皮腫の症例

Immunocytochemical study of podoplanin for distinguishing reactive mesothelial cells from adenocarcinoma in body cavity fluids

Kazuko ABE¹⁾, C.T., C.I.A.C., Katsunori TAKASHIMA¹⁾, C.T., C.I.A.C., Tsukasa IGARASHI²⁾, M.D., Keiko OHTOMO²⁾, M.D., Noriko KIMURA¹⁾, M.D., F.I.A.C.

¹⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine, ²⁾ Department of Gynecology, Tohoku Rosai Hospital, Japan Labor Health and Welfare Organization

論文別刷請求先 〒 981-8563 仙台市青葉区台原 4 の 3 の 21 東北労災病院検査科 阿部和子

平成 17 年 8 月 4 日受付

平成 17 年 11 月 28 日受理

については組織標本（生検材料・手術材料）も同時に検討した。

2. 方法

細胞像の観察をパパニコロウ染色で行い、対象とする細胞にガラスペンを用いてガラスの裏側に目印をつけた。その後、カバーガラスをはずし塩酸アルコールで脱色をし、標本をリン酸緩衝液（PBS）で洗浄した後、ストレプトアビジンビオチン（SAB）法（ニチレイ）にて免疫染色を行った。免疫染色の操作手順は以下のとおりである。①0.3%過酸化水素加メタノール10分、②正常ウサギ血清10分、③抗ポドプラニン抗体（マウスモノクローナル、1：200、Angio Bio社）4℃にて一晚、④ビオチン標識ウサギ抗マウスIgG30分、⑤酵素試薬ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンビオチン（SAB）30分、⑥DAB発色10分、⑦ヘマトキシリンで核染、透徹、封入。対象としてヒト組織を同時に染色し、内在性リンパ管の内皮細胞が陽性に染色されるのを確認した。またポドプラニン抗体の代りにPBSを使用し免疫反応がないことを確認した。

3. 判定

細胞診では組織切片と異なり細胞は必ず細胞膜に包まれた状態で観察されるため、細胞膜に発現する膜タンパクの場合は細胞全体が陽性所見を呈する。したがって本研究では免疫染色の判定は、対象とした細胞がポドプラニンに対して胞体全体が明らかな免疫反応を発現した症例を+（陽性）、発現のみられなかった症例を-（陰性）とした。

III. 免疫染色結果

1. 反応性中皮細胞

症例は反応性中皮細胞が出現している胸水15例、腹水15例であり、反応性中皮細胞の出現形式は乳頭状集塊、平面的集塊、孤立散在性で細胞質はライトグリーン好性で厚みが認められた。核は類円形で軽度の大小不同があり、

小型の核小体1、2個が認められた。対象とした反応性中皮細胞は全症例でポドプラニン陽性を示した。乳頭状集塊は集塊の辺縁に、平面的集塊では細胞が均一に染色されたが、症例によっては発現の程度に強弱が認められた。散在性の細胞では最も強い発現性が認められた（Photo. 1, 2）（Table 1）。

2. 癌症例

ポドプラニンは癌症例で35例中33例（94%）が陰性で2例（6%）が弱陽性を示した。陰性を呈したのは肺癌、乳癌、胃癌の症例で重積を示す集塊、平面的集塊、孤立散在性の腫瘍細胞が認められたが、いずれもポドプラニンに対して免疫反応はみられなかった（Photo. 3）。組織標本でもリンパ管の内皮細胞は陽性を示したが腫瘍細胞は陰性だった。例外的に2例の卵巣の明細胞腺癌は重積を示す集塊の辺縁にわずかな陽性所見を示した（Photo. 4）。しかし、周囲に出現している反応性中皮細胞に比べると、その染色性の程度は弱かった。組織標本でも卵巣明細胞腺癌の腫瘍細胞の一部がポドプラニンに陽性を呈した。今回検討した卵巣癌は5例で明細胞腺癌以外の3例は漿液性乳頭状腺癌だったが、ポドプラニンに対し陽性所見は認められなかった（Table 1）。

3. 悪性中皮腫

症例は胸水2例、腹水1例で腫瘍細胞の出現形式は乳頭状集塊や孤立散在性で細胞質はライトグリーンに好染し、厚みがみられた。核は類円形で核クロマチンは増量し、1、2個の明瞭な核小体を有していた。また核の大小不同や多核細胞も高頻度に認められた。組織学的にはいずれも上皮型であった。3例すべての細胞がポドプラニンに対し、陽性を示した（Photo. 5）。反応の程度は、個々の細胞によって多少の強弱はみられたが、集塊で出現している細胞より孤立散在性の細胞がより強い発現を呈していた。組織標本では細胞膜に沿って陽性所見が認められた（Photo. 6）。

Table 1 Immunocytochemical results for podoplanin in body cavity fluids

Primary	Histology	Cases	Podoplanin immunoreactivity	
			+	-
Lung	Reactive mesothelial cell	30	30	0
	Small cell carcinoma	2	0	2
	Adenocarcinoma	8	0	8
Breast	Invasive ductal carcinoma	10	0	10
Stomach	Signet-ring cell carcinoma	5	0	5
	Poorly differentiated adenocarcinoma	5	0	5
Ovary	Clear cell adenocarcinoma	2	2	0
	Serous papillary adenocarcinoma	3	0	3
		65	32	33

IV. 考 察

パパニコロウ染色標本やギムザ染色標本で異型細胞が認められた場合、核所見や細胞質の染色性の所見だけでは反応性中皮細胞と腺癌の鑑別に苦慮するときがしばしばある。このような場合、鑑別に免疫染色が用いられ、多数の報告がされている⁴⁻¹⁰⁾。中皮細胞や中皮腫に特異的なマーカーとしてanti-human mesothelial cell (HBME-1)^{4,5,9)}、calretinin⁸⁾、epithelial membranen antigen (EMA)⁵⁾、thrombomodulin、cancer antigen 125 (CA125)⁶⁾などが知られ、腺癌のマーカーとしてはcarcinoembryonic antigen (CEA)⁷⁾、anti-human epithelial antigen (BerEP4)⁸⁾、epithelial specific antigen (Moc-31)⁸⁾などが用いられている。通常はこれらのマーカーを組み合わせる中皮腫か腺癌かの鑑別がされている。しかし標本枚数が限られている細胞診では複数のマーカーを使用できないことが多く、用いるマーカーの特異性や感度が重要になってくる。

HBME-1は、中皮細胞に高率に陽性を示す一方、肺癌や卵巣癌にも高い陽性所見を示し、肺癌15例中2例(13.3%)に、卵巣癌34例中26例(76%)に陽性だったと報告されている^{4,5)}。HBME-1陽性を示した肺癌の細胞像は粘液産生性で卵巣癌の細胞像に類似した細胞集塊を形成していたと報告されている⁵⁾。

CA125は中皮細胞と卵巣癌に陽性を示すが伊藤ら⁶⁾は大型反応性中皮細胞では強陽性を示すが、その一方、全く陰性の中皮細胞も認められ、中皮細胞と癌細胞における染色性に明らかな差は認められなかったと報告している。

Calretininは現在中皮腫の診断に最も有用とされており、Politiら⁸⁾の報告では中皮細胞に対して感受性は100%、特異性は80%と報告されている。しかしながら、その免疫染色性の判定が時に困難なことがあるのは多くの経験者が実感するところである。また、免疫染色の際には加熱処理による抗原賦活化が必要なため、細胞診に応用するのは無理なことが多い。

われわれが検討したポドプラニンの免疫染色性に関してであるが、中皮細胞30例すべて(100%)が陽性を示し、悪性中皮腫例でも3例中3例が陽性を示した。一方、肺の腺癌8例では全例陰性だった。それらの腫瘍は粘液産生性の腫瘍細胞が大型集塊を形成していたが、ポドプラニンの発現は全くみられなかった。組織標本でも同様で、肺癌の腫瘍細胞はポドプラニンは陰性で、陽性を示したのはリンパ管の内皮細胞のみだった。同様に乳腺や胃の腺癌も陰性を示したが、例外的に卵巣の明細胞腺癌の癌細胞が部分的に弱陽性を示した。しかし、その免疫染色の強度は周囲の

反応性中皮細胞よりもはるかに弱く、それにひきかえ癌細胞としての異型性は明らかであった。逆にポドプラニン陽性を呈する腺癌として卵巣の明細胞腺癌を推定することができるという利点も考えられる。全体として今回検討した腺癌症例では35例中33例が陰性だった。ポドプラニンの中皮細胞に対する感受性は100%、特異性は94%だった。

中皮細胞におけるポドプラニンが最も強い発現を呈したのは孤立散在性の反応性中皮細胞で、核の腫大と核小体が見られる細胞であった。反対に弱い発現を呈したのは、手術中の腹膜洗浄液でよくみられるシート状の集塊を示すほとんど正常の中皮細胞であった。症例によって発現の程度に多少の強弱が認められたが、核異型が強く腺癌との鑑別が必要と思われる反応性中皮細胞ほどポドプラニンは強陽性を示した。また、ポドプラニンは非癌症例、癌症例ともに組織球、好中球は陰性で紛らわしい反応は全くみられず、反応性中皮細胞と腺癌の鑑別だけでなく中皮細胞と組織球の鑑別にも有用であった。

反応性中皮細胞と悪性中皮腫の鑑別であるが、今回対象とした反応性中皮細胞30例と悪性中皮腫3例はポドプラニンが全症例で陽性を示した。その発現程度は細胞によって多少の強弱がみられたが、ポドプラニンによる両者の鑑別は困難と思われた。

ポドプラニンに対する抗体は比較的新しいため報告例は少ないが、中皮腫の診断に関して最近Ordóñez⁹⁾も40例の中皮腫と114例の腺癌の組織を免疫組織化学的に検討し、今まで中皮腫の鑑別に用いられてきた他の抗体よりもポドプラニンが優れていると著者ら³⁾と同様の報告をしている。ポドプラニンを細胞診で検討した研究は本報告が初めてであるが、今後さらに症例を増やして検討する予定である。

V. 結 語

ポドプラニンは体腔液の反応性中皮細胞と腺癌の鑑別において、特異性、感度の点から従来用いられてきた他の抗体よりも優れていると考えられる。今後、日常検査への応用が期待される。

本論文の要旨は第46回日本臨床細胞学会総会(2005年5月於福岡)にて発表した。

謝辞:本研究は独立行政法人労働者健康福祉機構医学研究補助金(平成17年度)の助成を受けた。

Abstract

Objective : Podoplanin is a highly specific marker for mesothelial cells and mesothelioma. We studied whether podoplanin antibody is useful in distinguishing reactive mesothelial cells from adenocarcinoma in body cavity fluids.

Study Design : Using a monoclonal antibody for podoplanin and a streptavidin - biotin complex kit, we immunocytochemically studied 30 cases of reactive mesothelial cells without cancer cells and 35 cases of cancer, i.e., 10 lung, 10 breast, 10 stomach, and 5 ovarian. The diagnosis of all carcinoma cases was confirmed histologically.

Results : Immunoreactivity to podoplanin was observed in all mesothelial cells and mesothelioma cells, but the majority of adenocarcinoma cells were negative for podoplanin. Of carcinoma cells, only clear cell adenocarcinoma cells of ovarian origin showed weak immunoreactivity to podoplanin. Podoplanin specificity was 94% and sensitivity 100%.

Conclusion : Podoplanin is highly specific for mesothelial cells and is useful in distinguishing reactive mesothelial cells from adenocarcinoma in body cavity fluids.

文 献

- 1) Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is downregulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151 : 1141~1150.
- 2) Breiteneder-Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H., Horvat, R., Amann, G., Kriehuber, E., et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes blood and lymphatic capillaries : podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999; 154 : 385~394.
- 3) Kimura, N., Kimura, I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Path Int* 2005; 55 : 83~86.
- 4) 岡本 聡, 今野 良, 高野忠夫, 我妻理重, 永瀬 智, 吉田祐司・ほか. 腹水 (腹腔洗浄) 細胞診における悪性卵巣腫瘍細胞と中皮細胞の鑑別法としての免疫組織化学. *日臨細胞誌* 1998; 37 : 389~393.
- 5) 杉島節夫, 安倍秀幸, 山口知彦, 河原明彦, 横山俊郎, 吉田友子・ほか. 悪性中皮腫に対する HBME-1 抗体と EMA 抗体を用いた免疫細胞化学の有用性. *日臨細胞誌* 2001; 40 : 450~456.
- 6) 伊藤 仁, 篠田玲子, 赤塚由子, 覚道健一, 長村義之. 中皮細胞の免疫細胞化学検討. *日臨細胞誌* 1987; 26 : 581~584.
- 7) 椎名義雄, 依田さつき, 飯島淳子, 沢田好明. 体腔液細胞診における Carcinoembryonic antigen (CEA) 検出の診断的意義. *日臨細胞誌* 1986; 25 : 37~44.
- 8) Politi, E., Kandaraki, C., Apostolopoulou, C., Kyritsi, T., Koutselini, H. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. *Diagn Cytopathol* 2005; 32 : 151~155.
- 9) Ordóñez, N.G. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Human Pathol* 2005; 36 : 372~380.
- 10) 亀井敏昭, 佐久間暢夫. 中皮, 中皮腫と腺癌の鑑別. *日臨細胞誌* 1999; 47 : 601~613.

Photo. 1 Sheet-like mesothelial cells positive for podoplanin (podoplanin immunostaining, $\times 40$).

Photo. 2 Reactive mesothelial cells strongly positive for podoplanin (podoplanin immunostaining, $\times 100$).

Photo. 3 Pulmonary adenocarcinoma cells negative for podoplanin (podoplanin immunostaining, $\times 100$).

Photo. 4 Ovarian clear cell adenocarcinoma (center) weakly positive for podoplanin. Note strong immunoreactivity in reactive mesothelial cells adjacent to carcinoma cells (podoplanin immunostaining, $\times 40$).

Photo. 5 Mesothelioma cells strongly positive for podoplanin (podoplanin immunostaining, $\times 40$).

Photo. 6 Histology of mesothelioma cells showing strong immunoreactivity to podoplanin (podoplanin immunostaining, $\times 20$).