

— 迅速免疫細胞染色 —

術中迅速細胞診への応用と実際

片山博徳

丹野正隆、岩瀬裕美、磯部宏昭、柳田裕美
日吾美恵子、鈴木美紀、細根 勝
(日本医科大学多摩永山病院 病理部)

平田智己、吉野直之
(日本医科大学多摩永山病院 呼吸器外科)
前田昭太郎

(日本医科大学多摩永山病院 病理部 /
三菱化学メディエンス病理細胞診センター)

内藤善哉
(日本医科大学病理学講座)

はじめに

術中迅速細胞診は現在、術中迅速組織診の補助的診断法ではなく、相補的診断法として施行され、迅速細胞診断だけで術式が決定されることも少なくない。

当院では1996年より診断困難例に遭遇した場合に迅速免疫染色を行い、組織型、原発巣の推定に役立てている。

今回、迅速細胞診へ免疫細胞染色を併用する技術を症例と共に報告する。

迅速診断症例数

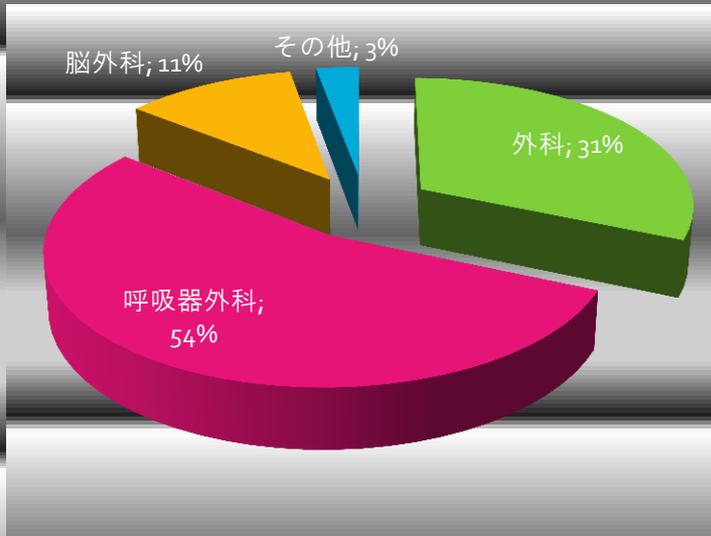
- 組織診断 866例
- 細胞診断 74例
- 組織・細胞診断併用 20例

- 迅速免疫組織染色 80例
- 迅速免疫細胞染色 35例

2007年4月～2012年6月

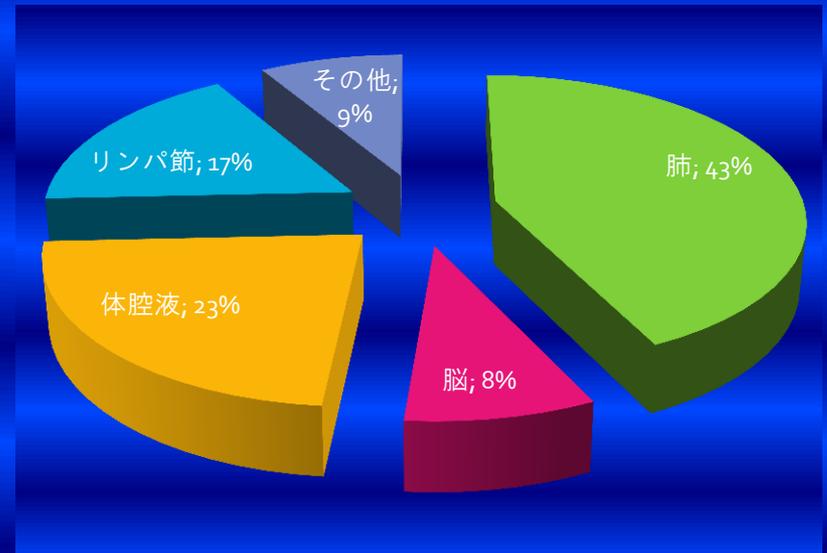
迅速免疫細胞染色 症例一覽

No.	性別	年齢	検体名	臨床診断	抗体名	染色結果	細胞診判定	細胞診診断	組織診断
1	F	36	肺FNA洗浄液	右肺上葉(S3)腫瘍、転移性肺腫瘍疑い(胃ca. ope後)	CK7,NapsinA,Villin	CK7,NapsinA (+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma(肺)
2	F	53	腹水	直腸癌、卵巣クルツケンベルグ腫瘍	Keratin,villin	villin少数 (+)	5	adenocarcinoma	metastatic adenocarcinoma(大腸)
3	F	55	肺FNA	左肺癌	NapsinA	+	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
4	F	15	脳圧挫	脳腫瘍	GFAP	+			Astrocytoma(良性)
5	F	60	頭骸骨捺印	転移性頭骸骨腫瘍(中咽頭癌)	Keratin,Vimentin,LcA,CD3	Vimentin,LcA (+)			Malignant Lymphoma
6	M	80	肺FNA	左上葉肺腺癌疑い	NapsinA,PSA	NapsinA (+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
7	M	50	縦隔リンパ節捺印	右肺癌(大細胞癌)	Keratin,chromograninA,CEA	Keratin (+)			adenocarcinoma
8	M	61	肺FNA洗浄液	右下葉肺癌	NapsinA,CK7,CK20	NapsinA,CK7 (+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
9	M	70	肺FNA洗浄液	右下葉S6腫瘍	NapsinA,CK7,CK20	CK7,CK20 (+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
10	M	71	縦隔リンパ節捺印	肺癌疑い(adenoc ca.)	CK7,CK20,NapsinA,TTF1,ChromograninA,CD56,CEA,Synaptophysin	CK7,TTF1,CD56,CEA (+)			Large cell neuroendocrine carcinoma
11	F	81	肺ABC洗浄液	右肺癌疑い	NapsinA	+	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
12	M	53	脳圧挫	脳腫瘍(転移性)	Thyrogrobin,NapsinA,CK7,CK20,GFAP	CK7 (+)			metastatic adenocarcinoma(胃)
13	M	72	肺FNA	Lt. Lung tumor (S6)	NapsinA	-	4	adenocarcinoma	adenocarcinoma
14	F	61	肺FNA	Lt. LK susp. (adenoc ca. susp.)	NapsinA	+	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
15	F	85	肺FNA洗浄液	右肺癌の疑い	CK7,CK20,NapsinA	CK7,NapsinA (+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
16	F	33	脳圧挫	脳腫瘍	EMA,MIB-1	EMA (+)			meningioma(境界)
17	M	66	肺FNA洗浄液	右肺癌	CK7,CK20,NapsinA,TTF1,Villin	CK7,CK20 (+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
18	M	84	胸壁捺印	Lt. Chest wall tumor	PSA	+			metastatic adenocarcinoma(前立腺)
19	F	76	縦隔腫瘍捺印	縦隔腫瘍(悪性リンパ腫疑い)	AE1/AE,LcA	AE1/AE3 (+)			adenocarcinoma
20	M	60	肺FNA洗浄液	右肺癌	CK7,CK20,CAM5.2,CD15	CK7,CAM5.2(+),CK20,CAM5.2一部(+)	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
21	M	74	椎体骨圧挫	前立腺癌、転移性脊椎腫瘍疑い	PSA	-			diffuse large B cell lymphoma
22	M	64	腹水	rectal ca.	CEA	+	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
23	F	48	大網腫瘍捺印	横行結腸癌	CEA,CAM5.2	+			metastatic adenocarcinoma(大腸)
24	F	48	腹水	横行結腸癌	CEA	-	1or2		
25	F	70	肺捺印	右肺腫瘍(meta susp.)	CK7,CK20,NapsinA,Villin,TTF-1	-			metastatic adenocarcinoma(大腸)
26	F	70	肺擦過	右肺腫瘍(meta susp.)	CK7,CK20,NapsinA,Villin,TTF-1	-			metastatic adenocarcinoma(大腸)
27	F	36	リンパ節捺印	甲状腺癌 頸部リンパ節転移疑い	AE1/AE	-	1or2		
28	M	70	肺捺印	左転移性肺腫瘍の疑い(大腸癌)	NapsinA,Villin,CDX2	villin (+)	5	adenocarcinoma	metastatic adenocarcinoma(大腸)
29	F	53	腹水	胃癌	Villin	+	4	adenocarcinoma	adenocarcinoma
30	M	70	胸水	胃癌	CEA	+	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
31	M	70	腹水	胃癌	CEA	+	5	adenocarcinoma	adenocarcinoma
32	M	73	肺タッチ	肺癌	CK7,CK20,NapsinA,Villin1	+	5	metastatic adeno	adenocarcinoma
33	F	79	腹水	胃癌	CEA	-	1or2		
34	F	67	リンパ節	乳癌	CK19	-	1or2		
35	F	75	胸水	肺癌	CEA	-	1or2		

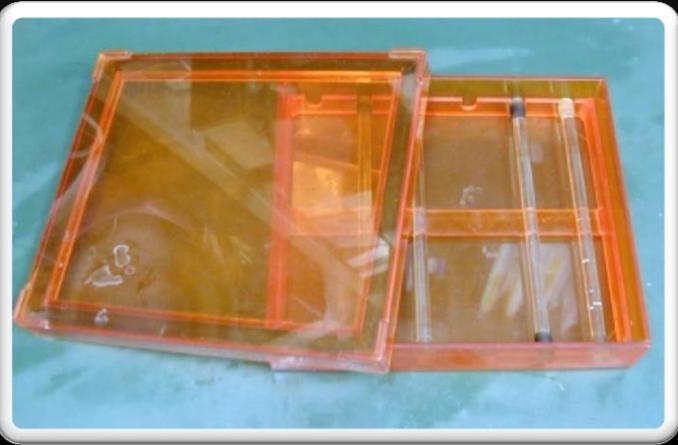


頻度の高い提出先

頻度の高い提出臓器



迅速免疫細胞染色法で使用した器具



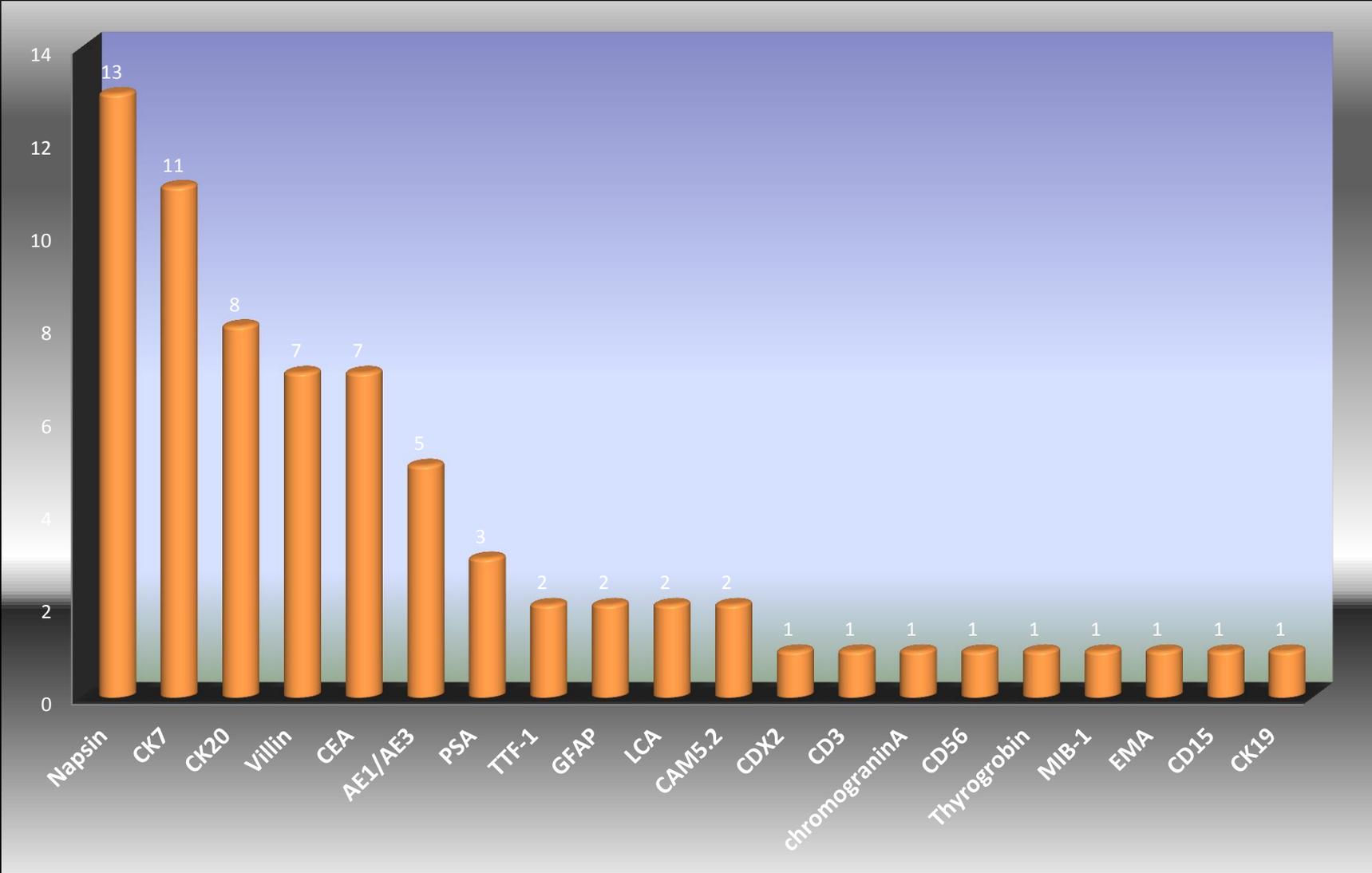
- 洗浄ビン入り洗浄Buffer
- 湿潤箱
- マイクロピペット

迅速細胞免疫染色に使用している抗体

Antigen	Source	Clone	Titer
GFAP	DAKO	6F-2	1:20
S-100	DAKO	Polyclonal	1:20
Keratin	DAKO	AE1/AE3	1:20
CK5/6	DAKO	MNF116	1:20
CEA	NICHIREI	COL-1	Prediluted
HMB-45	DAKO	HMB45	1:20
PSA	DAKO	ER-PR-8	1:20
CA125	DAKO	M11	1:20
CA19-9	DAKO	116-NS-19-9	1:20
EMA	DAKO	E29	1:20
Vimentin	DAKO	clone:V9	1:10
LCA	DAKO	2B11 + PD7/26	1:20
CD3	DAKO	Polyclonal	1:10
CD20	DAKO	L26	1:20
CD31	DAKO	JC70A	1:20
CD34	DAKO	QBEnd10	1:20
F-VIII	DAKO	55k-2	1:20
Chromogranin A	DAKO	DAK-A3	1:40
CK7	DAKO	OV-TL 12/30	1:20
CK20	DAKO	Ks20.8	1:10
NapsinA	IBL	TMU-Ado2	1:20
TTF-1	DAKO	8G7G3/1	1:20
Villin	NOVO CASTRA	CWWB1	1:20
ER,PgR	DAKO	ER;1D5,PgR;Pgr636	1:20
Caretinin	ZYMED	Polyclonal	Prediluted
D2-40	DAKO	D2-40	1:20

使用する抗体濃度はパラフィン切片に用いる場合の約5~10倍高濃度

使用頻度の高い抗体



迅速免疫細胞染色法で使用した試薬

- 1次抗体

- 2次抗体

 - EnVisionポリマー試薬 (DAKO)

- DAB試薬

 - ChemMate ENVISIONユニバーサルキット
(DAKO)

- マイヤーのヘマトキシリン

- TBS(Tween-20加Tris buffer saline)

検体処理方法

固形検体

(脳腫瘍、リンパ節など)

検体の性状により捺印法、擦過法、圧挫法等を選択する

液状検体

(体腔液、腫瘍穿刺吸引針内洗浄液など)

オートスメア法: 1,800rpm、1分遠心

(15mm × 15mmのチャンバーを使用)

検体処理のポイント

1. 検体の塗沫は厚くなりすぎないようにする

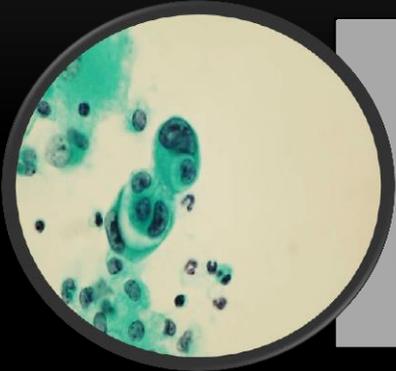
- 通常よりも固定時間が短時間な為、塗沫が厚すぎると細胞がプレパラートから剥離しやすい。
- 沫細胞が重なっていると判定に時間を要したり、判定が困難な場合も生じる可能性がある

2. 25～35mmのカバーガラスで封入出来る範囲に塗沫する

- 塗沫範囲が広いと染色手技が煩雑になるので、塗沫範囲を限定する
- 抗体など試薬の使用量を少なくすることができる

3. 陰性コントロール用のスライドも作製する

固定

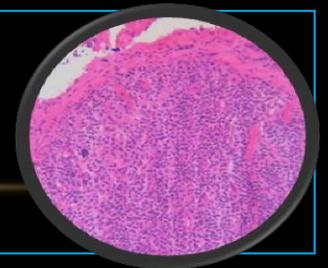


95%エタノールで約1分間固定
(通常の細胞診固定液を使用)

* 組織の固定

OCT compoundで包埋後、4~5 μ mの凍結切片を作製し
迅速用固定液で30秒~1分間固定する。

エタノール:ホルマリン:酢酸 = 9:1:1



染色手順—1



- 1次抗体反応中、陰性コントロールはTBSに入れておく
- 内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止の有無は判定に支障がないために現在この操作は省略している

染色手順－2



- 抗体などの洗浄は洗浄ビンを用いTBSで5～10秒洗浄する
- 陰性コントロールは2次抗体から検体と同時に染色を進める
(このステップまでTBSに入れておく)

染色手順-3

DAB反応
1分

Buffer洗浄
(TBS)

水洗

対比染色 (マイヤーのヘマトキシリン)

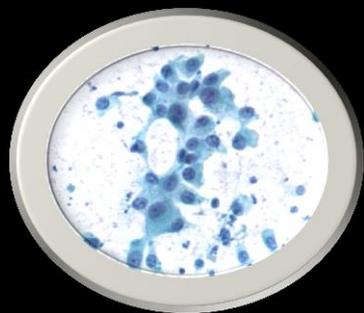
カバーガラスをのせ判定
(グリセリンを使用すると封入が容易)

脱水

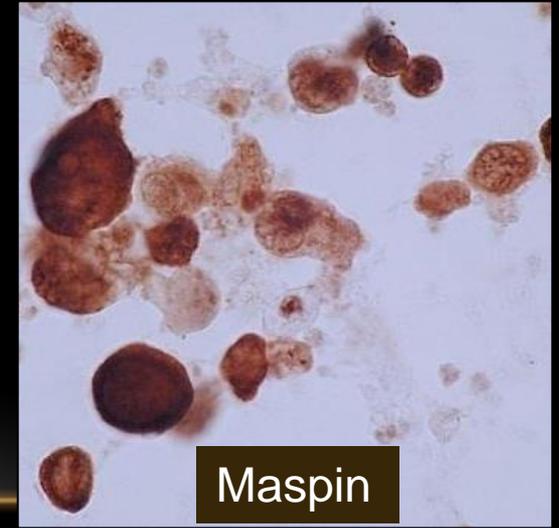
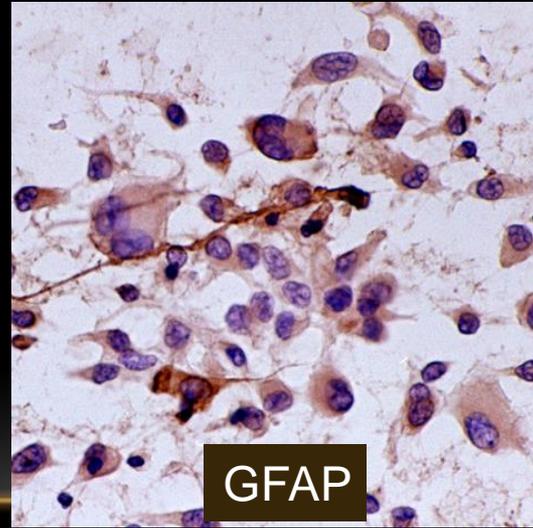
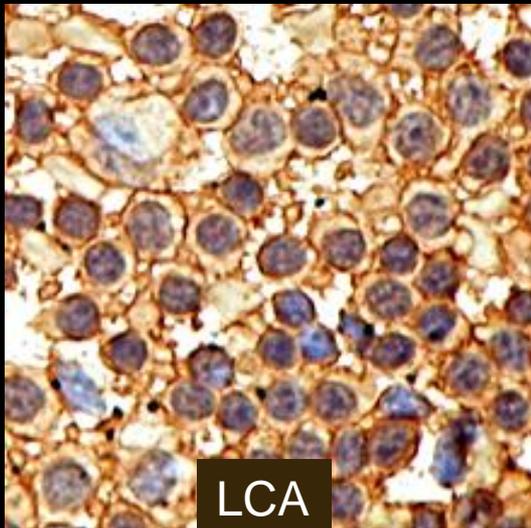
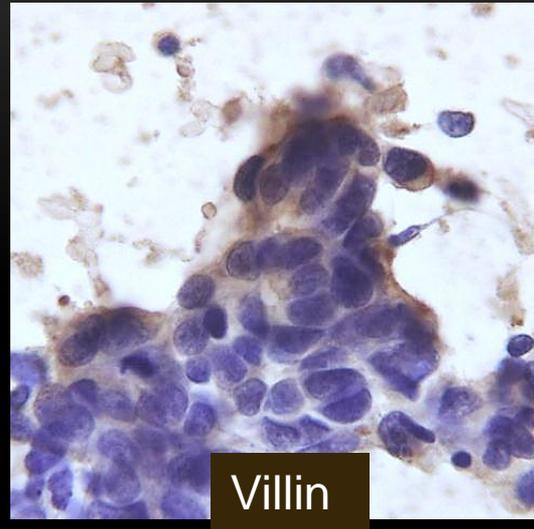
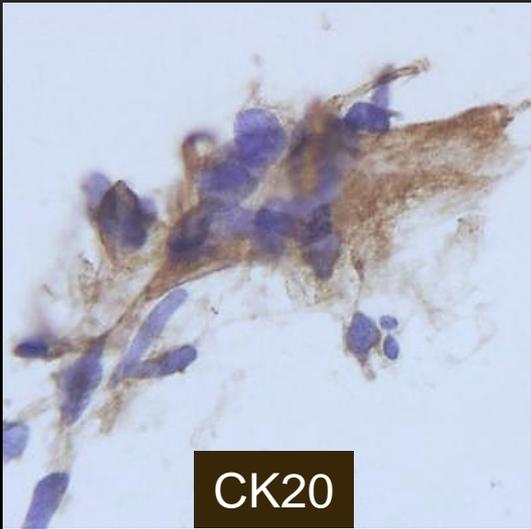
透徹

封入

NapsinA



迅速免疫細胞染色による染色態度

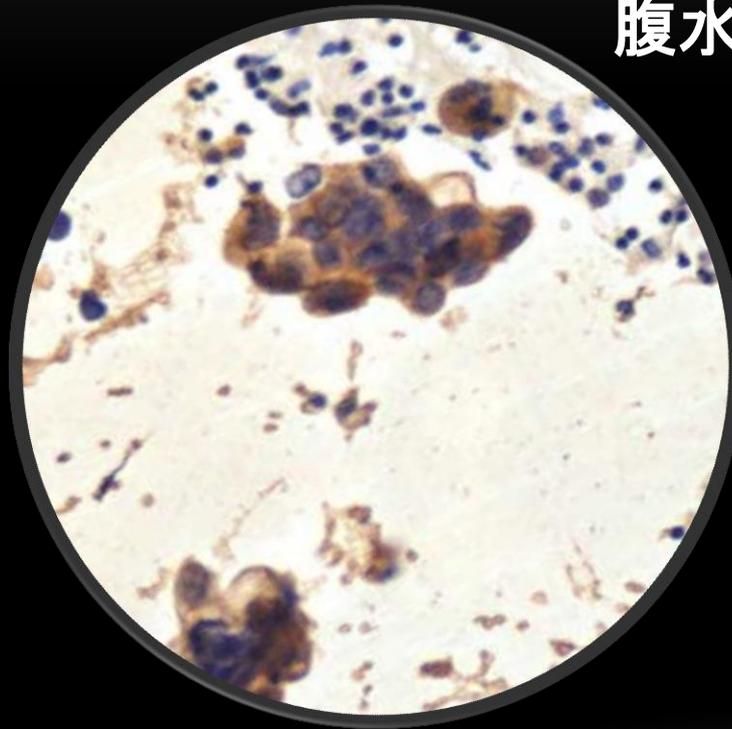


迅速免疫細胞染色のための検討

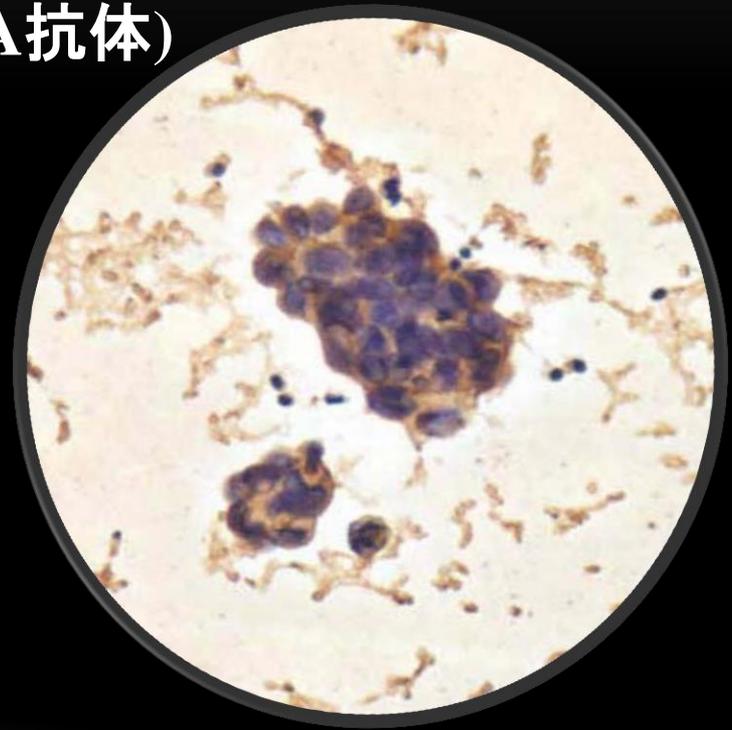
- 内因性ペルオキシダーゼ活性阻止の有無による染色への影響
- 1次抗体の反応時間による発色濃度の比較
- 検出系の反応時間による発色濃度の比較
- 抗CEA抗体のNCAとの交差反応

内因性ペルオキシダーゼ活性阻止の有無による染色への影響

腹水(抗CEA抗体)



処理あり

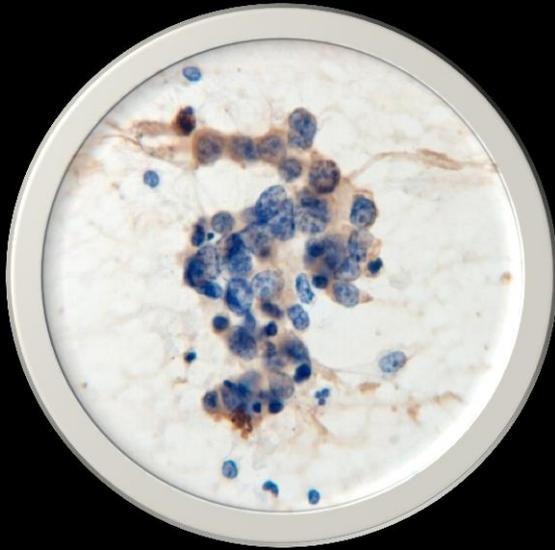


処理なし

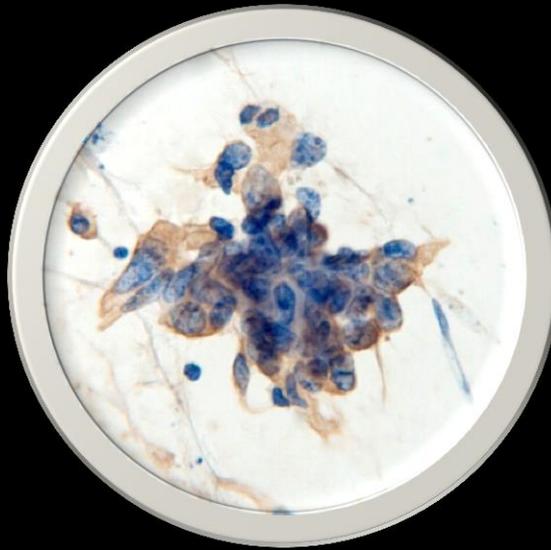
過酸化水素水によるブロッキング処理を行わなかった場合、行った場合に比べて赤血球に若干の非特異的反応がみられたが、判定には支障無かった。

1次抗体の反応時間による 発色濃度の比較

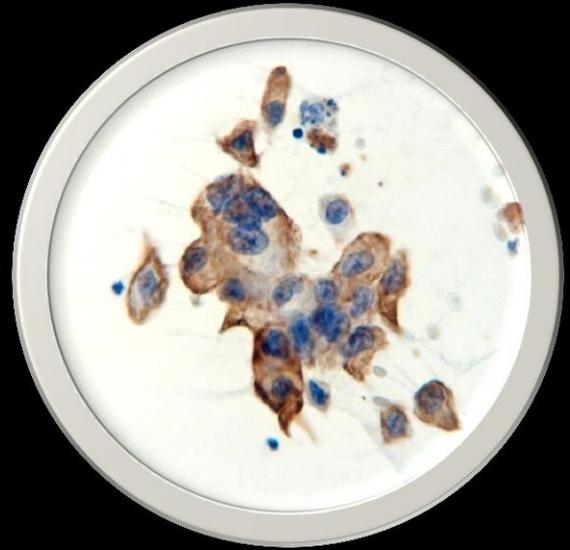
リンパ節 捺印(抗Keratin)



1分



3分

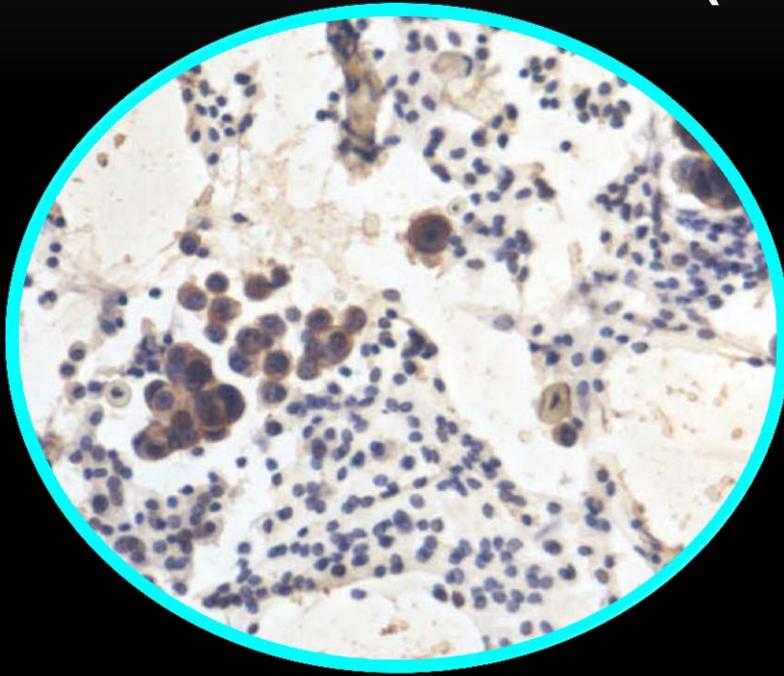


5分

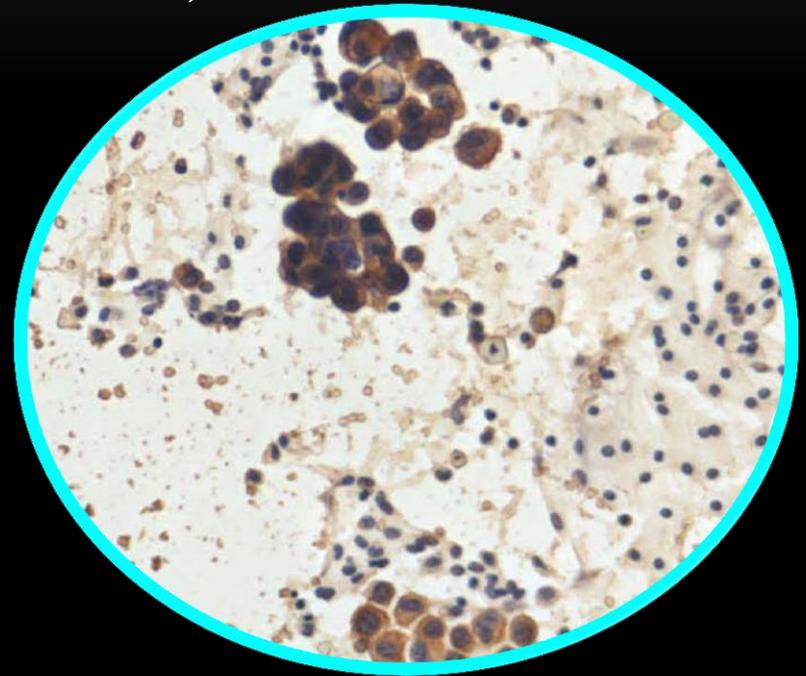
1次抗体の反応時間は、1分の場合には少し発色が弱かったが、3分以上反応させた場合は判定に十分な発色濃度が得られた。

検出系の反応時間による 発色濃度の比較

腹水(抗CEA抗体)



3分

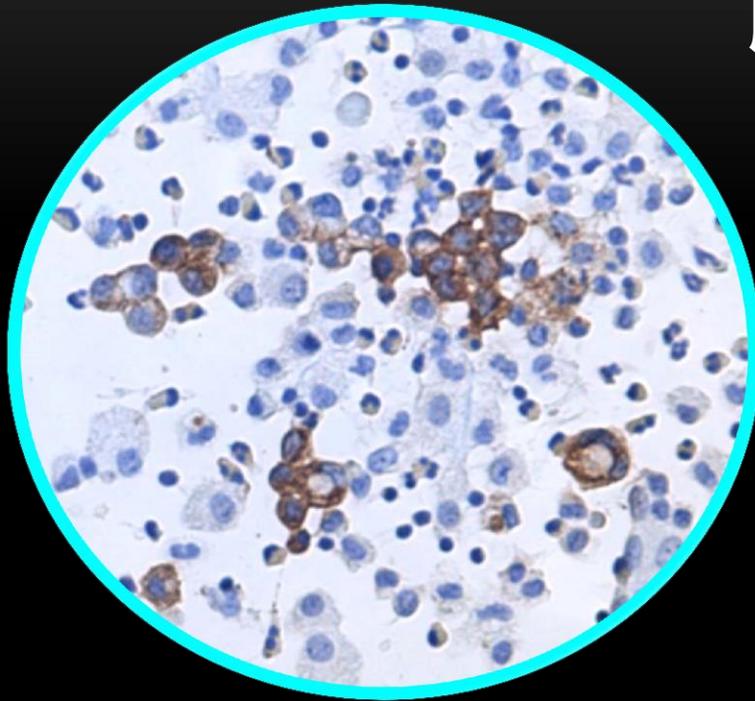


6分

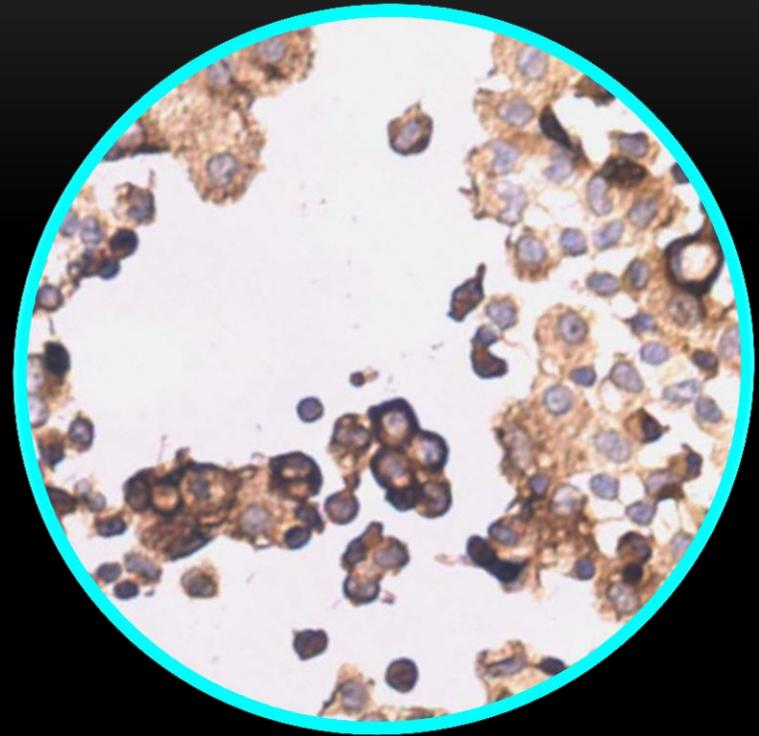
2次抗体の反応時間は、3分で判定に十分な発色濃度が得られた。
反応時間が6分になると背景や赤血球にも弱い発色がみられた。

抗CEA抗体のNCAとの交差反応

腹水



NCA吸収抗体



NCA未吸収抗体

NCA (Non-specific Cross-Reacting Antigen)吸収抗体は、腫瘍細胞のみに明瞭な陽性所見が認められた。好中球との反応はほとんど見られず、判定が容易だった。

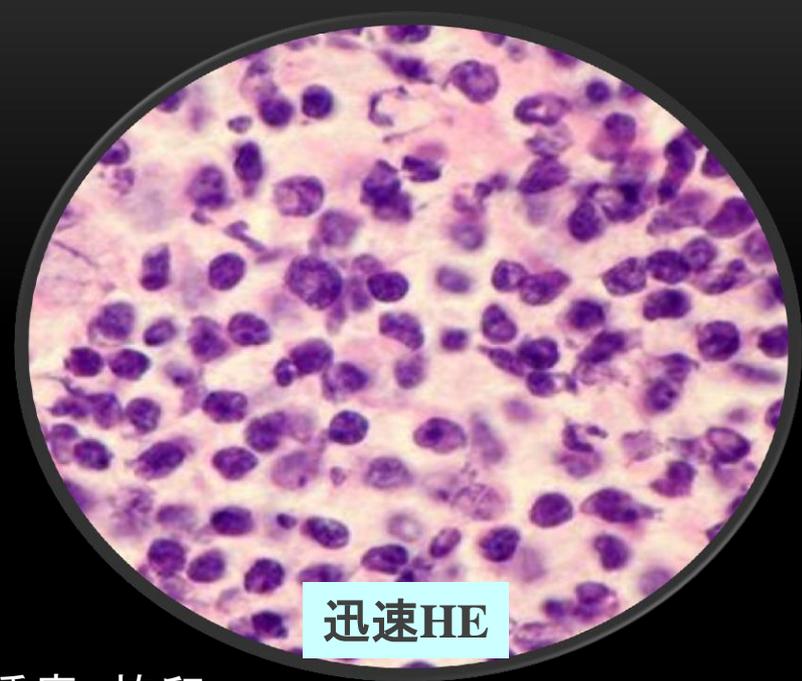
迅速免疫細胞染色のポイント

- 試薬、抗体の管理、器具機材の準備など、各施設で行いやすい方法を選択する



技術的な検討を自施設で行うことは、
良い結果を得るうえで最良といえる

B細胞性悪性リンパ腫

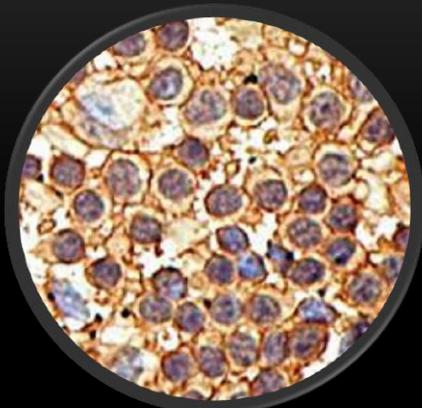


検体：縦隔腫瘍 捺印

- 73歳、男性
- 大動脈弓下方、気管の左、肺動脈の頭側に腫瘍を認め、悪性リンパ腫を疑い、全身検索を行ったが、縦隔以外に病変を認めず、胸腔鏡下生検の方針となった。術前のカンファレンスにおいて悪性リンパ腫も鑑別の対象となり術中の迅速免疫染色の必要性についてディスカッションされた。術中の細胞、組織像から第1に悪性リンパ腫を考え、迅速免疫染色を施行した
- 術中迅速細胞診では粗大顆粒状のクロマチンパターンを呈するN/C比の高い
- やや大型の異型細胞が単調に認められた。
- 組織、細胞像から第1に悪性リンパ腫を考えLCA,CD3,CD20の迅速免疫染色を行った。

迅速免疫染色 結果

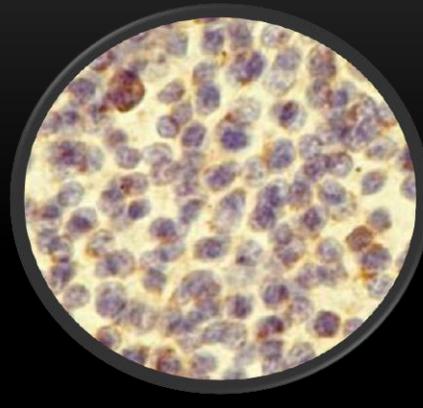
迅速細胞診



LcA

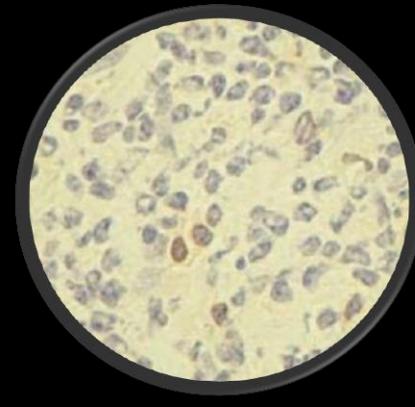
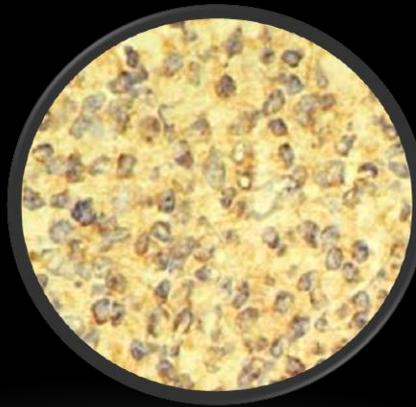


CD20



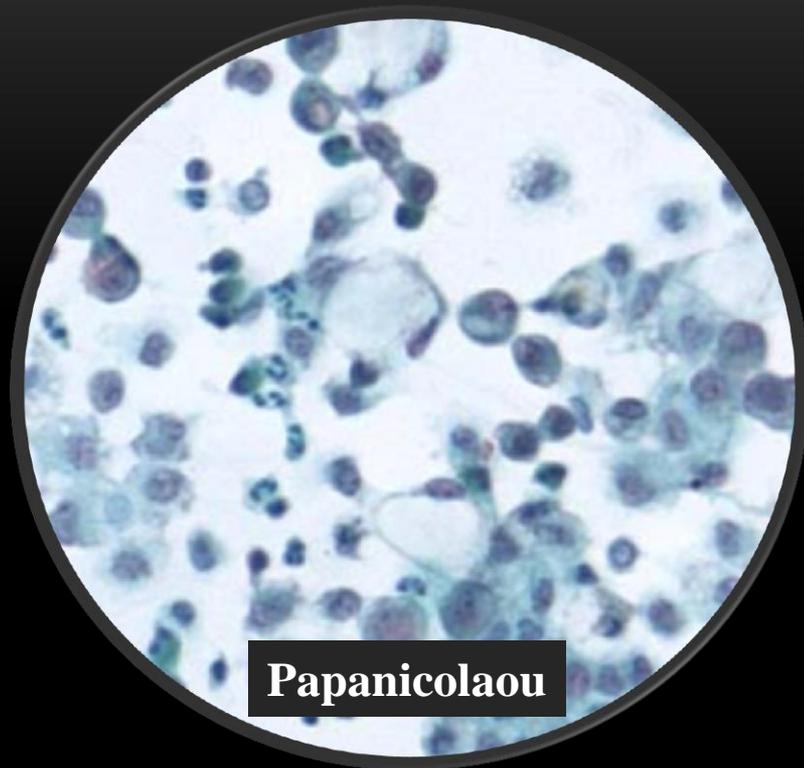
CD3

迅速組織診



LCA, CD20(+)であり、B細胞性悪性リンパ腫と術中迅速診断した。
術後の免疫染色においてもLCA, CD20の他CD19,IgM,IgD, κ 鎖が陽性となった。

迅速細胞診 検体：腹水 53歳、女性



Papanicolaou



Villin

胃癌の術中に腹水の迅速細胞診を施行。

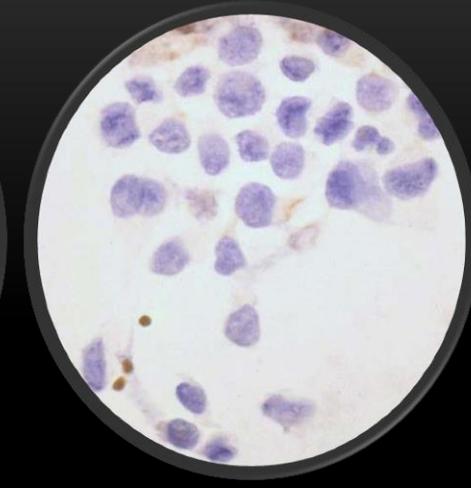
標本上には、中皮細胞と共に小型異型細胞が散見されたが、細胞所見のみでは良悪性の鑑別が困難であったため、迅速免疫染色を施行した。

- 炎症細胞、中皮細胞と共に小型でN/C比が高く核クロマチン増加した細胞が散見された（少数）。

迅速免疫細胞染色 肺腫瘤からのFNAC材料



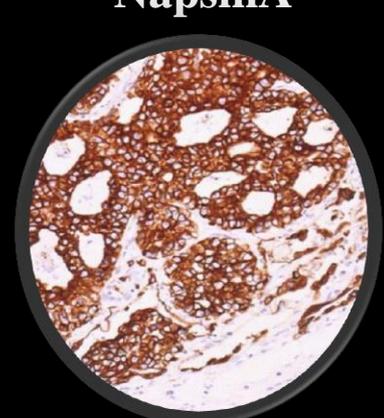
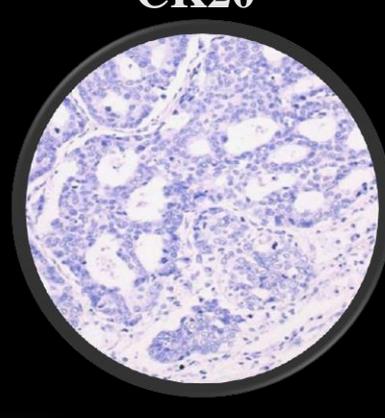
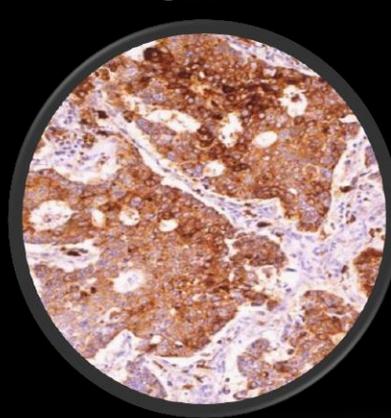
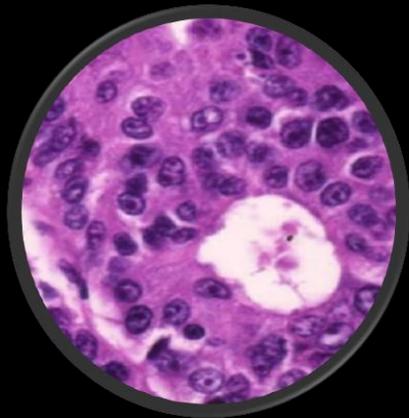
CK7



CK20



NapsinA



- 乳頭状クラスターがみられ、核偏在しN/C比が高く核型不整、核小体の目立つ異型細胞が認められた。
- 迅速免疫染色では、**CK7(+),CK20(-)**で、**NapsinA (+)**であった。
以上の結果より、原発性肺腺癌と術中迅速診断した。

まとめ

- 迅速免疫細胞染色は固定終了後、約10分で判定でき、術中迅速診断に対応可能であった。
- 細胞単位の判定では、凍結組織と比較して細胞診材料の方が容易な症例もあった。
- 当院では迅速診断は原則的に予約制をとり、問題症例においては臨床との術前カンファレンスが行われ、迅速免疫染色の必要性について検討される。よって、抗体の準備等について事前確認が可能であり、迅速免疫染色の時間短縮につながる。また通常業務の妨げになることも少ない。



第26回日本臨床細胞学会関東連合会学術集会

COI開示

片山博徳

今回の演題に関して開示すべきCOIはありません。