
原 著

Multi-color/target fluorescence *in situ* hybridization
(Mt - FISH) 法及び免疫染色 (ICC) 法を用いた腹腔細胞診の検討

奈良県立医科大学病理診断学講座

榎本 泰典, 笠井 孝彦, 武田 麻衣子, 高野 将人,
森田 剛平, 柳生 貴裕, 嶋田 亜也, 森川 佐和子,
野々村 昭孝

奈良県立医科大学附属病院病理部

西川 武

THE UTILITY OF MULTI-COLOR/TARGET FLUORESCENCE (Mt-FISH) *in situ*
HYBRIDIZATION AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY (ICC) METHODS
IN PERITONEAL CYTOLOGY

YASUNORI ENOMOTO, TAKAHIKO KASAI, MAIKO TAKEDA, MASATO TAKANO,
KOUHEI MORITA, TAKAHIRO YAGYU, AYA SHIMADA, SAWAKO MORIKAWA
and AKITAKA NONOMORA

Department of Diagnostic pathology, Nara Medical University

TAKESHI NISHIKAWA

Pathological Department of Nara Medical University Hospital

Received June 17, 2011

Abstract :

Introduction: Utility of Mt-FISH analysis in peritoneal cytology has not been well elucidated so far. In the present study, therefore, peritoneal cytology in 63 patients with malignant and non-malignant diseases was studied in different three methods, Papanicolaou and Giemza cytology (Pap), ICC, and Mt-FISH, to evaluate the utility and availability of ICC and Mt-FISH in peritoneal cytology.

Materials and methods: Peritoneal cytology specimens of 63 patients were collected from the files of the Pathology Section, Nara Medical University Hospital, including 54 cases of adenocarcinoma (33 of gastrointestinal or biliary, 18 ovarian or endometrial, and 3 primary peritoneal cancers) and 9 cases of benign lesions (6 benign tumors and 3 non-tumor lesions). Results of the three different methods were evaluated and compared.

Results: Incidence of positive malignancy rate was 20% (11/54) in Pap method, 36% (18/50) in ICC, and 59% (20/34) in Mt-FISH. When compared to Pap method, sensitivity and accuracy were statistically significantly higher in Mt-FISH, but not in ICC. No inadequate or insufficient specimens were found in Pap method, but these were found in

6 % of lavage cytology and 8% of ascitic cytology in ICC specimens and 14% of lavage cytology and 31% of ascitic cytology in Mt-FISH specimens, respectively.

Conclusion: ICC and Mt-FISH methods are very useful additional methods for accurate diagnosis of peritoneal cytology. But the incidence of inadequate or insufficient cytology specimens was higher in Mt-FISH of ascitic cytology, and the methods of processing the ascitic fluid for Mt-FISH must be improved and are now under consideration.

Key words : peritoneal cytology, Multi-color/target fluorescence in situ hybridization (Mt - FISH), immunocytochemistry (ICC)

I. はじめに

体腔内の遊離癌細胞を確実に及び早期に検出することは、予後の予測や早期の治療開始に繋がり重要であるが、しばし活動性中皮細胞が癌細胞と紛らわしい形態を示し診断に難渋することがある。そのための体腔液細胞診の補助診断法としては、従来から免疫染色法(以下, ICC 法)や微量腫瘍細胞検出のため Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法等による遺伝子解析等が行われている¹⁻⁶⁾が、我々が調べた限りではこれまでに Multi-color/target fluorescence *in situ* hybridization (Mt - FISH) 法による検討の報告はない。そこで今回我々は、免疫染色法及び Mt - FISH 法による遺伝子異常細胞の検出が、腹腔細胞診(以下, CY)において悪性腫瘍細胞同定に有用であるか検討を行った。

II. 対象と方法

当院病院病理部に 2008 年 8 月から 2009 年 6 月に提出された腹腔細胞診 63 例のパパニコロウ染色及びギムザ染色(以下, pap 染色)を用いた通常細胞診結果を、補助診断法として用いた ICC 法の結果及び Mt-FISH 法を用いた遺伝子異常細胞数の検索結果と比較検討した。腹腔細胞診 63 例は、54 例の腺癌(消化器系 33 例, 婦人科系 18 例, 腹膜癌 3 例)、9 例の良性腫瘍性疾患(子宮筋腫 1 例, 卵巣粘液性嚢胞腺腫 3 例, 卵巣漿液性嚢胞腺腫 1 例, 卵巣子宮内膜症性嚢胞 2 例, 結核性子宮内膜炎 1 例, 肝硬変症 1 例)からなる。なお、消化器系の癌 33 例の内訳は、胃癌 24 例, 膵癌 4 例, 胆管癌 2 例, 結腸癌 2 例, 虫垂癌 1 例であり、婦人科の癌 18 例は、すべて腺癌症例を用いた(卵巣癌 9 例, 子宮体癌 9 例)(Table 1)。

Table 1. Summary of clinical diagnosis and source of peritoneal cytology of 63 patients in this study

	Number of cases	Peritoneal lavage cytology	Ascitic cytology
Gastric cancer	24	22	2
Ovarian cancer/peritoneal cancer	12 (9/3)	9	3
Pancreatic cancer/biliary tract cancer	6 (4/2)	4	2
Cancer of uterine body	9	8	1
Colon cancer/appendiceal cancer	3 (2/1)	1	2
Benign tumors/disease	9 (6/3)	7	2
total	63	51	12

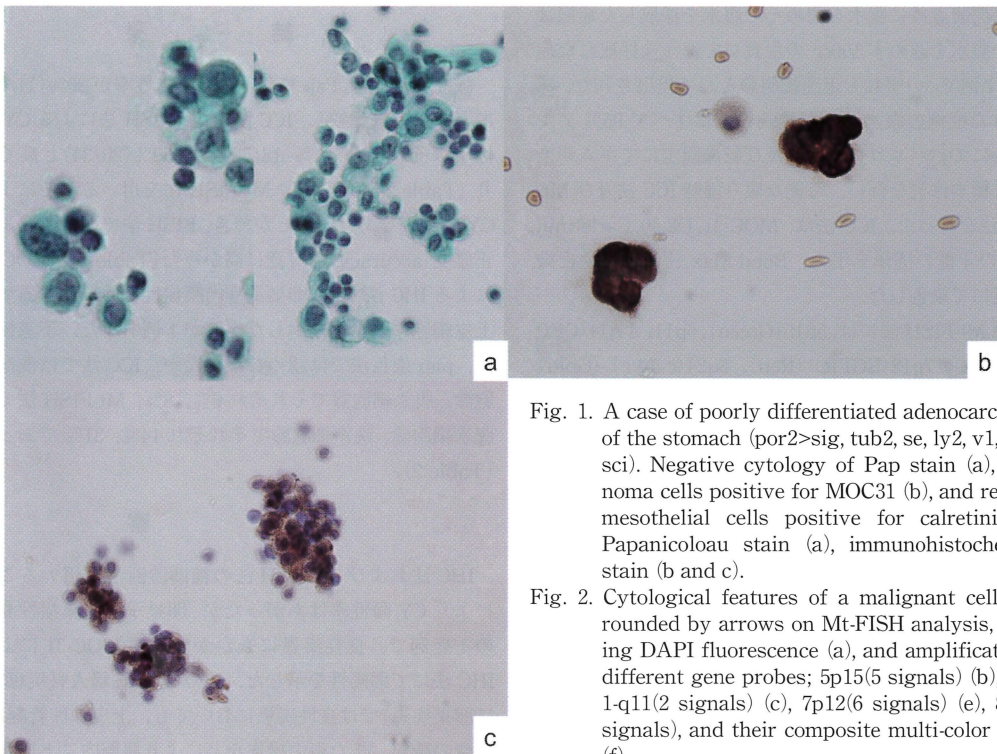


Fig. 1. A case of poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach (por2>sig, tub2, se, ly2, v1, INF γ , sci). Negative cytology of Pap stain (a), carcinoma cells positive for MOC31 (b), and reactive mesothelial cells positive for calretinin (c). Papanicolaou stain (a), immunohistochemical stain (b and c).

Fig. 2. Cytological features of a malignant cells surrounded by arrows on Mt-FISH analysis, showing DAPI fluorescence (a), and amplification of different gene probes; 5p15(5 signals) (b), 6p11.1-q11(2 signals) (c), 7p12(6 signals) (e), 8q24(7 signals), and their composite multi-color image (f).

Fig. 1

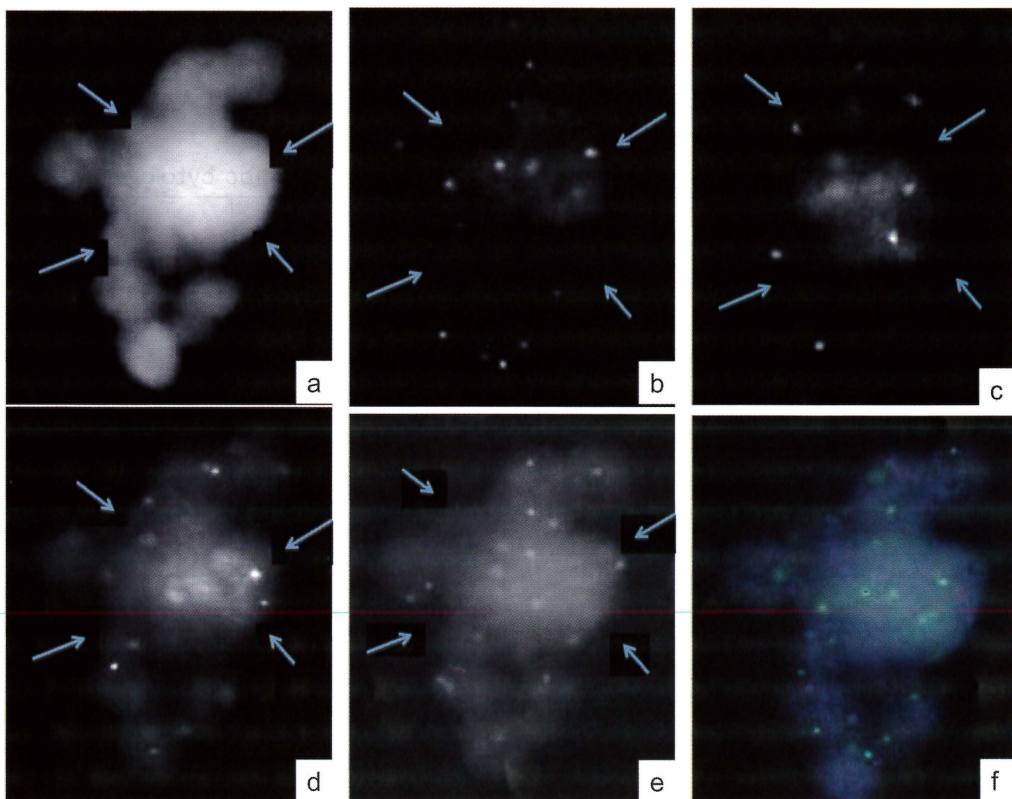


Fig. 2

また開腹直後に腹水を認めその腹水を採取した症例は12例、腹水を認めず100ccの生食にて洗浄後採取した症例は51例で、いずれも迅速細胞診として提出された。採取された症例の腹水及び腹腔洗浄液はすべて95%アルコールにてパパンニコウ染色及び乾燥固定にてギムザ染色にて標本作製を行い、可能な限り随時ICC法及びMt-FISH法を行った。ICC法は、MOC-31, D2-40, Carletinin, CD68の4種の抗体を用い、Bond Max社の自動免疫染色装置にて染色した。

またMt-FISH法には、5p15(Green), 6p11. 1-q11(CEP6)(Aqua), 7p12(EGFR)(Red), 8q24(c-myc)(Gold)の4種の染色体領域のプロープからなるabbott社LAVysion Multi-color Probe Setを使用し、蛍光顕微鏡Leica社DM6000Bにて観察した。解析Softには、LeicaFW4000を使用した。判定の際には、細胞診ではpositive, suspiciousをCY(+), negativeをCY(-)とした。ICC法では出現細胞の5%以上に陽性所見を有するものをCY(+)(Fig. 1), 5%未満をCY(-)とした。Mt-FISH法では、それぞれのプロープにつき3つ以上のシグナルが観察されるものを増幅と定義し、4種のプロープ(5p15, 6p11. 1-q11, 7p12, 8q24)のうち1種以上で出現細胞の5%以上に増幅を有するものをCY(+)(Fig. 2), 5%未満をCY(-)とした⁷⁾。

III. 結 果

腺癌症例では、Pap染色法のCY陽性率が20%(11/54)であったのに比較し、ICC法やMt-FISH法によるCY陽性率はそれぞれ36%(18/50)及び59%(20/34)と高くなり(Table 2)、ICC法やMt-FISH法を用いることにより、CY陽性率をあげることができ、FISH法での感度および正確度(accuracy)が有意に高かった(Table 3)。MOC-31によるIHC法では、卵巣子宮内膜症性嚢胞に伴う異型腺上皮細胞に弱陽性を示した症例が1例あった。不適検体は、pap染色法では認めなかったが、ICC法では洗浄細胞診、腹水細胞診でそれぞれ6%、8%、Mt-FISH法では腹水細胞診、洗浄細胞診でそれぞれ14%、31%であった(Table 2)。

IV. 考 察

IHC法およびMt-FISH法の補助診断法を用いることによりCY陽性率はあがったが、卵巣子宮内膜症性嚢胞の1症例で、良性疾患にもかかわらずMOC-31によるIHC法にて弱陽性を示した。このことは、婦人科疾患(特に卵巣疾患)では良性疾患においても、上皮の卵管經由、病変の破綻、また術中操作などにより腹腔内に上皮が出現し、MOC-31で陽性を示すことがあり、判定には注意を要すると思われた。しかしながら、Mt-FISHではさら

Table 2. The incidence of positive finding of the peritoneal lavage and ascitic cytology in three different diagnostic methods; pap, ICC, and Mt-FISH

51 cases of peritoneal lavage cytology				12 cases of Ascitic cytology			
	Pap	ICC	Mt-FISH		Pap	ICC	Mt-FISH
carcinoma	7/44 (16%)	13/41 (32%)	15/27 (56%)	carcinoma	4/10 (25%)	5/9 (56%)	5/7 (71%)
Benign tumors /disease	0/7 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	Benign tumors /disease	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Number of improper specimens	0/5 (0%)	3/49 (6%)	5/37 (14%)	Number of improper specimens	0/12 (0%)	1/12 (8%)	4/13 (31%)

Pap, Papanicolaou cytology; ICC, Immunocytochemistry; Mt-FISH, Multi-color / target fluorescence *in situ* hybridization

Table 3. Sensitivity, specificity and accuracy of three different diagnostic methods; Pap, ICC and Mt-FISH

CY			
Method	Sensitivity(%)	Specificity(%)	Accuracy(%)
Pap ^a	11/34(32)	7/7(100)	18/41(44)
ICC ^b	18/34(53)	6/7(86)	24/41(59)
Mt-FISH ^c	20/34(59)	7/7(100)	27/41(66)
P-value	a vs.b : n.s. a vs.c: p<0.05 b vs.c : n.s.	n.s.	a vs.b : n.s. a vs.c: p<0.05 b vs.c : n.s.

Pap, Papanicolaou cytology; ICC, Immunocytochemistry; Mt-FISH, Multi-color / target fluorescence *in situ* hybridization

に高い 59% の陽性率であったことは、腹水の通常の細胞診では見落としがある事を示唆し、腹水細胞診での Mt-FISH の有用性を示している。

不適検体数の割合は、pap 染色法に比較して IHC 法や Mt-FISH 法において高かった。一般に腹水細胞診は最終的な検体処理までの時間がかかっていることが多く、そのために不適検体数が増える可能性があるうえに、特に Mt-FISH 法による腹水細胞診は、変性や出血などの二次的な影響による不適検体が多く、その検体の保存や処理などに十分な注意が必要であるとともに今後さらに改善して行く必要があると考えられた。

VI. 結 語

腹腔細胞診において、ICC 法および Mt-FISH 法を用いることで腫瘍細胞の検出頻度をあげることができ、補助診断法として有効であることが示された。今後の課題として、補助診断法における不適検体数をより減らすことおよび偽陽性率の検討の必要性があげられる。今後、さらなる症例数を追加して検討するとともに、各臓器別の細胞診の有用性についての検討も行い報告したい。

謝 辞

症例の提供およびご協力いただきました臨床各科の先生方に深く感謝致します。

文 献

- 1) 海老原善郎, 亀井敏昭: 消化器領域における腹腔洗浄細胞診. 体腔液アトラス 147-151, 2005.
- 2) 西山みどり, 山崎志寿子, 高橋剛, 吉田康雄, 岸田由紀子, 薬丸一洋, 高山昇二郎: 悪性中皮腫と肺腺癌の鑑別について—中皮腫と鑑別が問題になった腺癌の比較検討—. 日本臨床細胞学会誌 35:409-418, 1996.
- 3) 杉島節夫, 安倍秀幸, 山口知彦, 河原明彦, 横山俊朗, 吉田友子, 鹿毛政義, 渡辺次郎: 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. 日本臨床細胞学会誌 40: 450-456, 2001.
- 4) 岡本聡, 今野良, 高野忠夫, 我妻理重, 永瀬智, 吉田祐司, 五十嵐司, 佐藤信二, 矢嶋聡: 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. 日本臨床細胞学会誌

- 37 : 389-393, 2001.
- 5) 森永謙二：悪性胸膜中皮腫の診断精度の向上及び治療に関する研究. 厚生労働省 がん研究助成金による研究報告書 平成 15 年度
- 6) 佐久間暢夫, 亀井敏昭, 渋谷秀美, 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—. 日本臨床細胞学会誌 35 : 93-98, 1996.
- 7) Bubendorf, L., Müller P., Joos, L., Grilli, B., et al.: Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 123(4): 516-23, 2005.