

細胞診標本を用いた p16-FISH 法



松本慎二

福岡大学病院 病理部/病理診断科

1. はじめに

悪性胸膜中皮腫（MPM：malignant pleural mesothelioma）は、壁側胸膜の中皮細胞より発生する悪性度の高い腫瘍である。アスベスト（石綿）曝露による腫瘍発生の原因が明確になっており、産業従事者のみならず一部の地域では低濃度の環境曝露も顕在化している。本邦においても年間1000人以上の新たな中皮腫患者が増加しており、2030年から2034年の間に死亡者数のピークを迎えることが推定されている。MPMの予後は極めて不良で、効果的な治療法が確立されておらず、その平均生存中央値は9～17ヵ月と云われている。その予後の悪さの要因の一つとして、早期発見の困難さが挙げられる。壁側胸膜に病変が限局するような早期の段階では、画像診断で検出できるほどの明らかな腫瘍性病変を作らず、また一般

的に早期中皮腫の形態診断において、炎症などに起因する反応性中皮細胞過形成（Reactive mesothelial proliferations：RMPs）との鑑別診断が困難なことが多いためである。MPMと反応性中皮細胞との鑑別診断において、EMA、Glut-1、CD146やDesminなど幾つかの免疫学的マーカーが報告されているものの、その特異度において完全といえるものはない。さらに中皮腫であっても標本中に多くの反応性中皮細胞が混在することが両者の鑑別をより困難にし、その正確な形態学的診断基準が確立されていないのが現状である。

1994年、Cheng等によって中皮腫におけるp16遺伝子を含む染色体9p21領域のホモ欠失（2本の相同染色体上の両方が欠失する）が報告された。以来、多くの研究者らによって、中皮腫における様々な割合でのp16遺伝子のホモ欠失と、組織や細胞診標本を用いたFISH法（Fluorescence In Situ Hybridization）の中皮腫診断への有用性が報告されている。特筆すべきは我々の研究結果も含めて、未だに反応性中皮細胞過形成症例においては、欠失が認められない点、即ち特異度が100%であり、中皮腫と反応性病変との鑑別において非常に有効な診断ツールとなり得るということである。

2. p16-FISH 法の実際

Fluorescence In Situ Hybridization

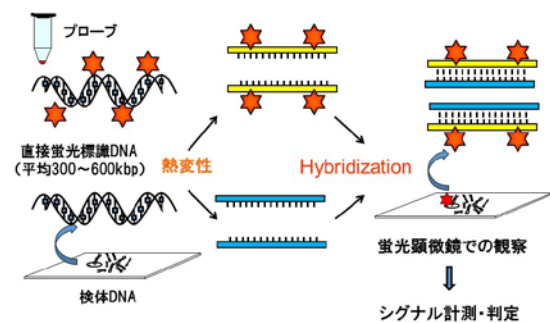


図1 FISH法の原理

FISH法は、目的とする遺伝子と特異的に結合するように設計され、かつ蛍光物質を標識したプローブと、検体DNAをプレパラート標本上でハ

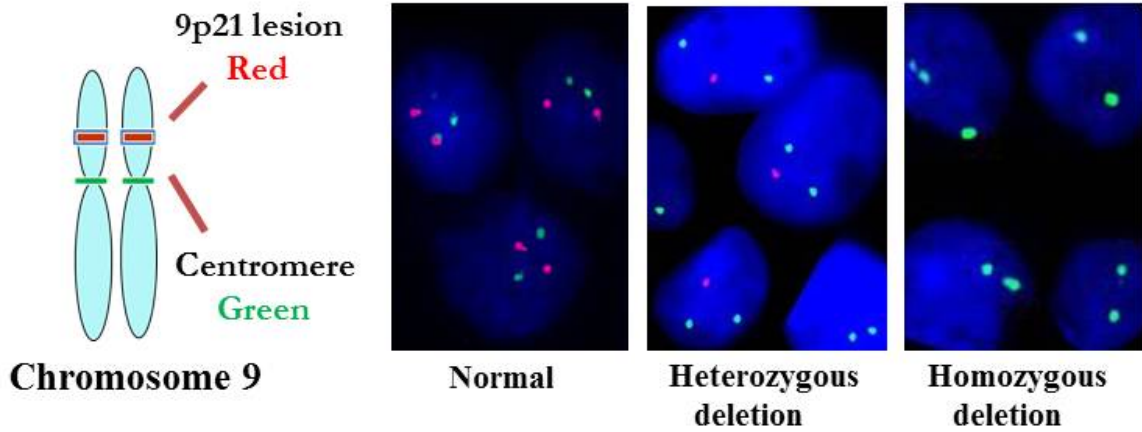


図2 p16 遺伝子の座位と FISH 法のシグナルパターン

イブリダイズさせることで、ある特定遺伝子の数的異常や転座などの構造異常を検出できる方法である(図1)。広く一般的に使用されている p16 遺伝子プローブは、本遺伝子が存在する 9p21 領域が赤の蛍光色素で標識されており、コントロールとしての9番染色体動原体が緑の蛍光色素で標識されている。正常細胞であれば、2本の相同染色体上に p16 遺伝子が存在するため、緑2個、赤2個のシグナルパターンを示す。一方、悪性中皮腫において p16 遺伝子を含む 9p21 領域が欠失すると赤のシグナルが欠損する。相同染色体の片方で欠失している場合

(ヘテロ欠失)は緑2個、赤1個となり、両方が欠失している場合(ホモ欠失)は、緑2個のみのシグナルパターンを示す(図2)。標本中の中皮細胞 100 個以上を観察し、各シグナルパターンの割合を算出する。我々の施設では、約 50 例の反応性中皮細胞過形成症例での結果を基に、ホモ欠失 10%以上を p16 遺伝子欠失のカットオフ値として設定している。

3. 細胞診脱色標本を用いた FISH 法

我々の施設での実際のプロトコールを示す(図3)。基本的に全体的な流れは、ホルマリン固定パ

FISH法の操作概略 (脱色標本)

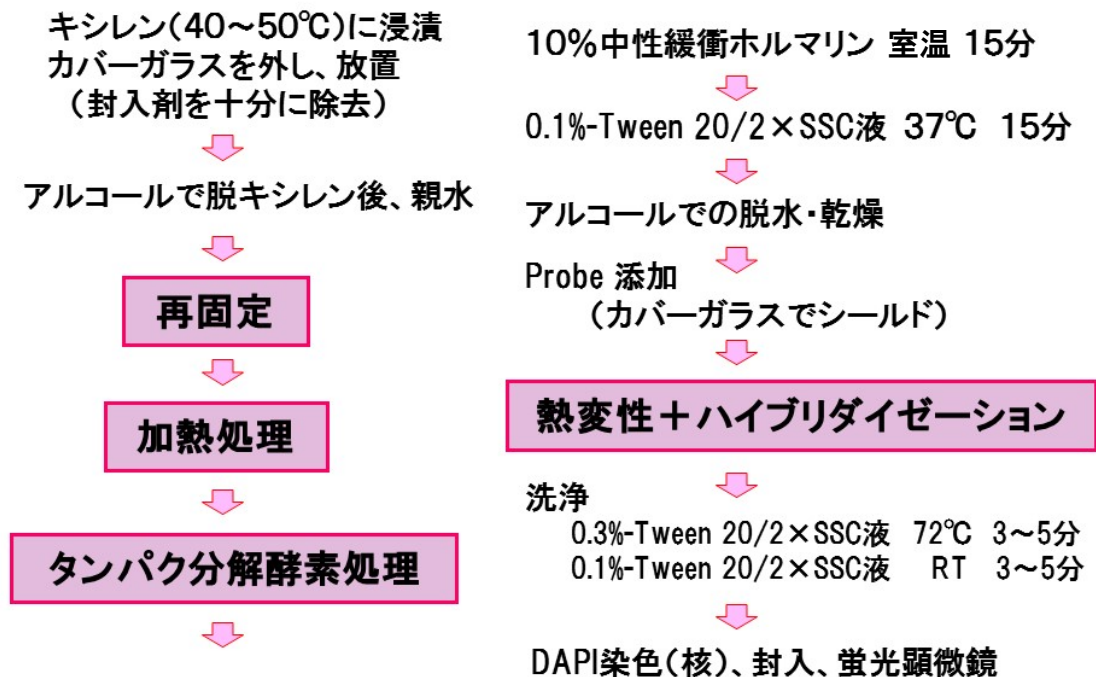


図3 細胞診脱色標本を用いた FISH 法の操作概略

ラフィン埋蔵 (FFPE) 標本での方法と同様であるが、脱色標本の場合には工程の追加や多少の微調整を行っている。以下に図3の赤枠で示したポイントとなる工程を概説する。

1) 再固定

プローブの核内への浸透をよくするために、熱処理およびタンパク分解酵素処理が行われるが、これらの操作により核や細胞質が融解し、細胞および集塊どうしが融合して判定に苦慮することが多い。また、脱色標本から行う場合、事前に写真等で記録していた目的の細胞が剥離してしまうことも少なくない。そこで、我々は加熱処理の前に、10%緩衝ホルマリンに1~2時間浸漬を行っている。また、Giemsa染色の場合にはCarnoy液に15分間浸漬を行う。この操作は、Giemsa染色の脱色操作も兼ねている。

2) 加熱処理

本操作は、蛋白間の架橋構造をほぐし、次のステップであるタンパク分解酵素処理を効き易くするのが目的である。我々は、0.1%-Tween20 加クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に80℃、10分間反応させている。なお、セルブロック標本の場合には、80℃、30分間行っている。

3) タンパク分解酵素処理

ヒストン蛋白や細胞骨格となる蛋白等を分解し、プローブの浸透を促進する操作であるが、このステップがFISH法の成功を左右する最も重要なポイントと考える。即ち、標本の種類および性状 (血液や粘液などの背景、細胞密度、新鮮度、保管期間) により、若干の微調整が必要となる。我々は、0.3%-pepsin (Sigma, P-6887) / 0.01N-HCl 溶液を用い、Pap.脱色標本の場合は15~20分間 (図4)、Giemsa脱色標本の場合は5~10分間 (図5, 6)、セルブロック標本の場合は90~120分間 (図7)、37℃の温浴槽で反応させている。反応時間に幅があるのは、先に述べたように標本性状に応じての微調整のためである。具体的には、集塊形成が強く、細胞密度が高かったり、古い標本の場合は、長めの処理を行い、逆に細胞密度が少なかったり、LBC標本の場合には、短めの処理を行うように調整している。

4) 熱変性+ハイブリダイゼーション

標本の種類に問わず、80℃で10分間の熱変性後、引き続き37℃で一晩ハイブリダイゼーションを行う。稀ではあるが、反応が弱い場合には48時

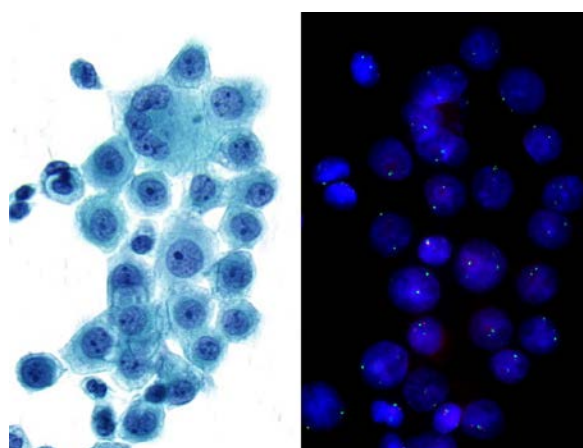


図4 Papanicolaous 染色脱色標本での p16-FISH 法

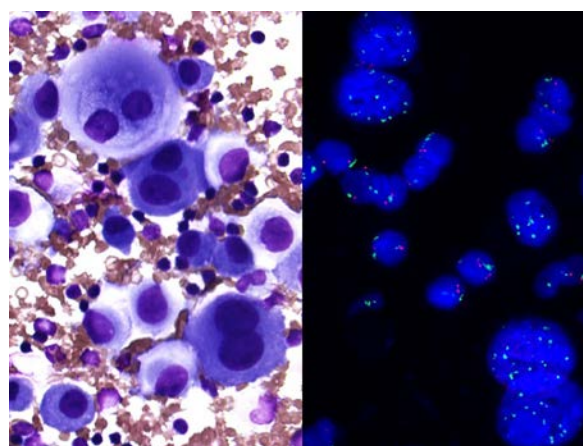
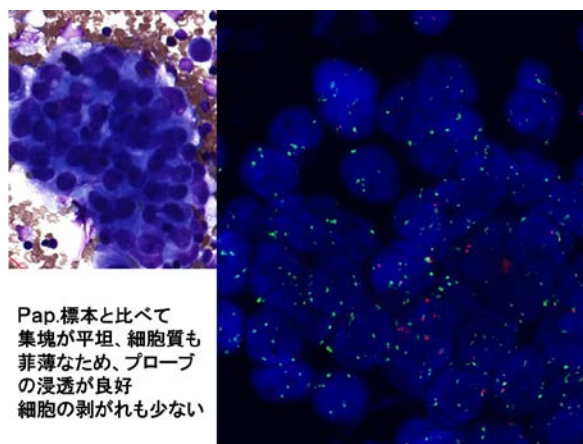


図5 Giemsa 染色脱色標本での p16-FISH 法



Pap.標本と比べて
集塊が平坦、細胞質も
菲薄なため、プローブ
の浸透が良好
細胞の剥がれも少ない

図6 Giemsa 染色脱色標本での p16-FISH 法

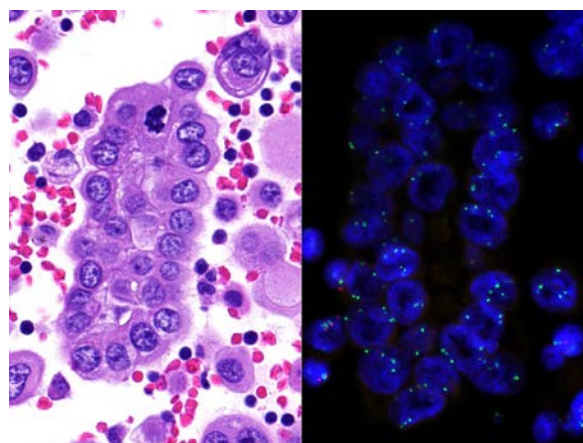


図7 セルブロック標本での p16-FISH 法

間ハイブリダイゼーションを行うこともある。

4. 中皮腫細胞の形態解析への応用

脱色標本を用いた FISH 法の最大の利点は、細胞像をあらかじめ写真やバーチャルスライド等で記録しておくことで、細胞形態と遺伝子異常の1対1の対比が可能になる点である。我々は、p16 遺伝子欠失が証明された中皮腫細胞と、正常パターンを示す反応性中皮細胞の形態比較を行った。具体的には、まず Pap 標本をバーチャルスライド化して保存した後、同一標本を用いて p16-FISH を施行。次にホモ欠失を示す細胞、言い換えれば中皮腫細胞として矛盾しない細胞のみをバーチャルスライド上でマークし、その細胞の形態解析を行った(図8)。同様に、反応性中皮細胞についても正常パターンを示す細胞にマークして、その形態解析を行い、最終的には両者間での出現頻度からカットオフ値の設定を試みた(図9)。その結果、15%以上の頻度で観察される相互封入像(hump 様細胞突起)、25%以上の 2 核細胞あるいは 5%以上の頻度で見られる 3 核細胞の出現、さらに 10 個以上の細胞より構成される球状あるいは乳頭状の細胞集塊の出現頻度が全体の 10%以上を占める、これらの所見が反応性中皮細胞との鑑別において、中皮腫診断の重要な細胞形態であることが判明した(図10)。

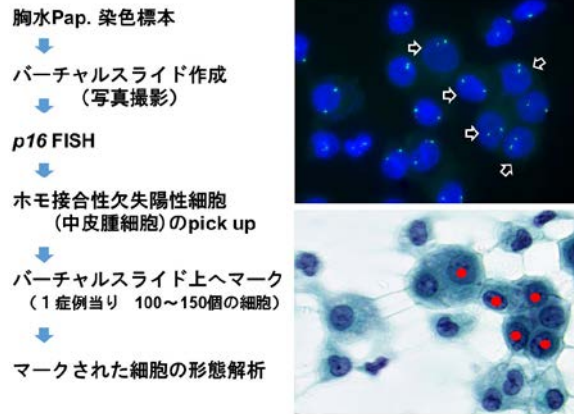


図8 脱色標本 p16-FISH 法による中皮腫細胞の形態解析

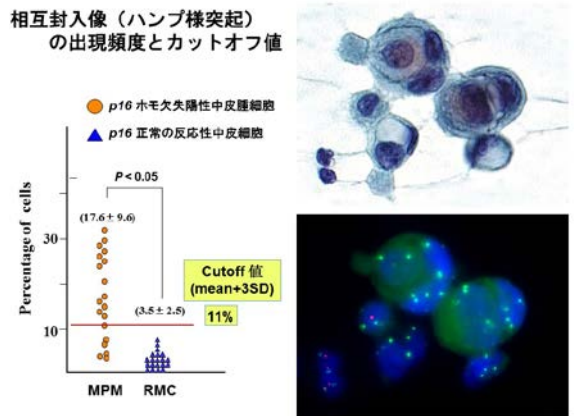


図9 RMC および MPM での出現頻度とカットオフ値の設定(相互封入像)

S.Matsumoto et.al, *Cancer Cytopathol* 121 (8): 415-422, 2013 より一部改変

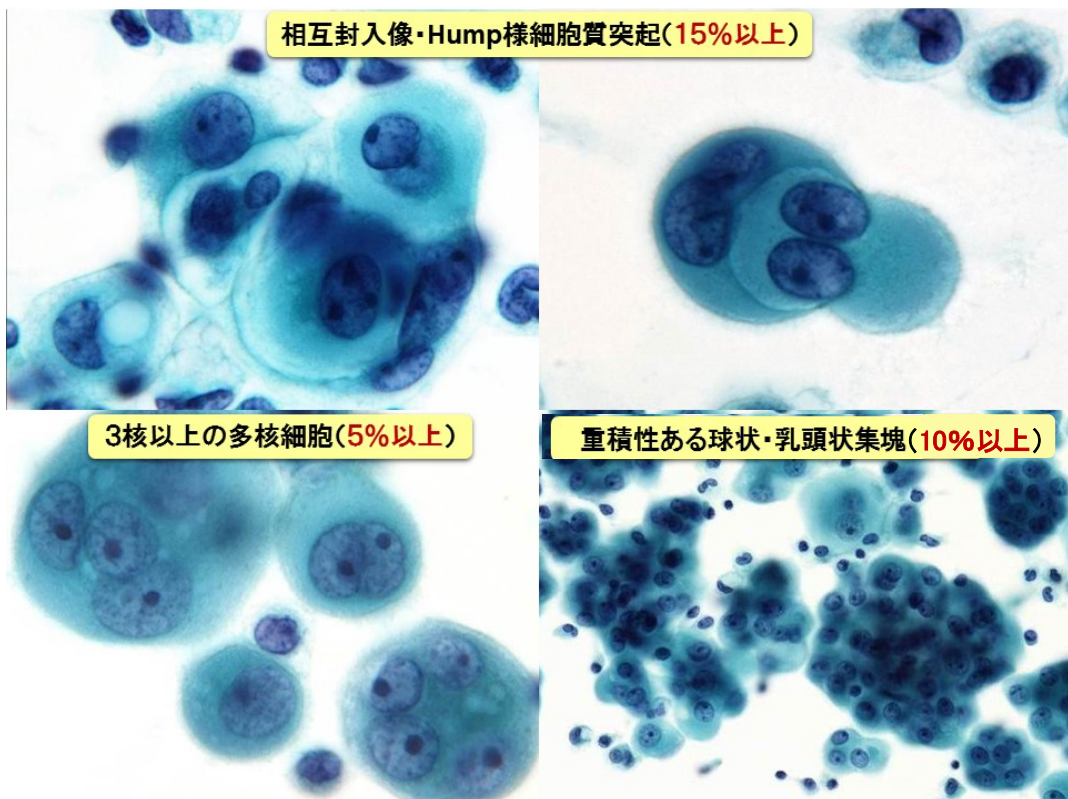


図10 p16 ホモ接合性欠失陽性細胞の形態学的特徴

5. p16-FISH 法の注意点

これまで述べてきたように p16-FISH 法は、悪性中皮腫診断において良悪鑑別マーカーとして感度、特異度ともに優れた診断手法である。しかし、以下に示す二点を熟知しておく必要がある。

①中皮腫 vs 反応性中皮細胞過形成の鑑別のみには有用である点。肺癌や膀胱癌などいくつかの癌腫においても、p16 遺伝子のホモ欠失が報告されているため、免疫化学染色にて少なくとも2種類以上の中皮細胞マーカー陽性、癌腫マーカー陰性の証明を行い、中皮細胞であることの確認は必須である。

②p16 ホモ欠失が陰性であっても、決して反応性中皮細胞とは断定できない点。我々のこれまでの150例以上の悪性中皮腫組織標本での p16 ホモ欠失陽性症例の割合は約 80%である。言い換えれば

約 20%の症例は p16 遺伝子異常を伴わない中皮腫である。従って、細胞診において p16 ホモ欠失が陽性の場合には中皮腫診断を支持する大きな根拠となり得るが、陰性の場合には、免疫染色の結果に併せて、細胞形態による最終判断が必要となる。そのためにも、臨床情報ならびに画像所見を十分把握し、臨床医と綿密なコンタクトを取り、慎重に対応することが重要である。

6. 最後に

脱色標本を用いた p16-FISH 法の有用性とその実際を述べたが、時間が経過した古い標本や細胞変性が高度な検体などでの反応性は必ずしも良好でなく、判定が不可能なこともある。一方、セルブロック標本では常に安定した結果が得られるため、日頃からセルブロック標本を作製しておくことを推奨する。

ちよつとひと工夫

90秒で染まる！

その2

Ultrafast Papanicolaou染色

皆さんの施設では迅速性が求められる細胞診にどのような染色法を選択していますか？ 当院では on site cytology や術中迅速診断時に 90 秒で染色可能な ultrafast Papanicolaou 染色 (UFP 染色) を採用しています。この染色法では乾燥標本を用いるため細胞剥離が少なく、再水和処理により赤血球が除去された clear な標本が得られます。ROSE や術中迅速診断などで Pap 染色と同等の情報量が必要な場合に有効な迅速染色法のひとつです。染色性は Pap 染色に類似しており違和感は少ないと思われませんが、湿固定標本に比べて細胞は大きくなり、コントラストが強くみえるため鏡検時には注意が必要です。

Ultrafast Papanicolaou 染色の手順

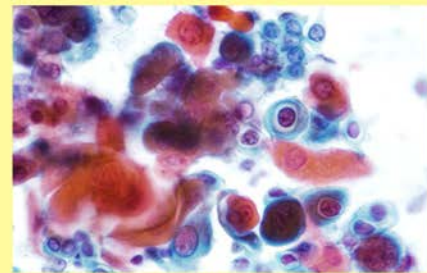
1. 乾燥固定標本を再水和処理 (生理食塩水)	30 秒
2. 95%エタノール	1 回浸漬
3. アルコール・ホルマリン固定液 ^{※1}	10 秒
4. 水洗	数回
5. Hematoxylin II ^{※2}	10~15 秒
6. 水洗	数回
7. 95%エタノール	数回
8. Cytostain ^{※3}	40 秒
9. 脱水・透徹	数回
10. 封入 (マリノール)	

※1 95%エタノール 2053ml とホルマリン原液 300ml を混和し蒸留水で全量を 3000ml とする。

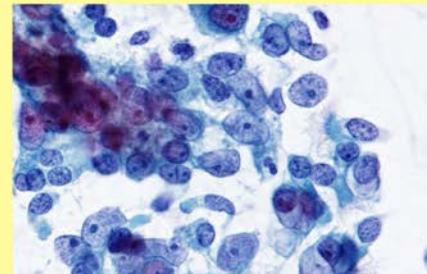
※2, ※3 Richard-Allan scientific 製。染色液はやや高価ですが、長期間の使用が可能。

香川大学医学部附属病院

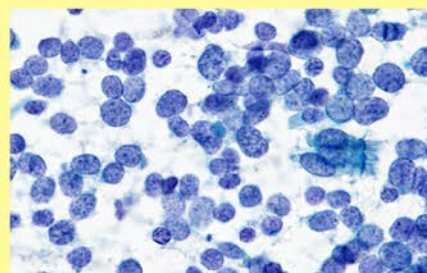
松永 徹



角化傾向が明瞭な扁平上皮癌では、診断がDiff-Quickより容易



湿固定標本に比して腫瘍細胞が大きくみえる、核小体明瞭な腺癌細胞



裸核状で核縁非薄な所見を呈し、blue bodyも観察された小細胞癌