

研究

p40免疫染色導入後の肺非小細胞癌に対する
細胞学的再検討吉田 章子¹⁾、馬野 真次¹⁾、末吉 範行¹⁾、竹村 しづき^{1) 2)}1) 独立行政法人地域医療機能推進機構滋賀病院 検査部
(〒520-0846 滋賀県大津市富士見台16-1)

2) 指月病理診断科

【要 旨】

肺扁平上皮癌のマーカーであるp40免疫染色を導入したところ、細胞診での細胞型の判定に誤りがあった症例があることが判明したため導入後の7症例に対し細胞学的に再検討を行った。特徴的所見とされる“流れ様配列”を重視し扁平上皮癌と診断したが、p40 (-)、TTF-1 (+) となり組織診では腺癌と診断された症例や、類円形でやや立体感のある核と好酸性かつ類円形の大型核小体を示し、腺癌の特徴的所見を有していると考えたが、p40 (+)、TTF-1 (-) となり組織診では扁平上皮癌と診断された症例があった。p40の導入により、腺癌と扁平上皮癌の鑑別が困難であった症例や非小細胞癌としか判定できなかった症例の組織型が確定することが多くなり、各細胞型に特徴的とされてきた細胞所見について再考する契機を得た。細胞型の判定にはこれまで以上の慎重な観察が求められ、その際に免疫染色を用いることが必要な場合もあると考えられた。

キーワード

lung (肺), non-small cell carcinoma (非小細胞癌), immunostaining (免疫染色), p40, cytology (細胞診)

はじめに

肺非小細胞癌は主に腺癌と扁平上皮癌に分類される。以前は治療の観点から、肺腫瘍は小細胞癌と非小細胞癌の鑑別が最も重要とされてきたが、現在では分子標的治療薬の開発に伴い非小細胞癌と分類するだけでなく、腺癌か扁平上皮癌か組織型を明確にすることが必要とされている。しかし扁平上皮癌が非角化型である場合や材料が気管支擦過などの新鮮材料である場合、組織型の鑑別には苦慮することがある。2015年にWHO分類が改訂され、組織型の鑑別が形態学的に困難な場合は免疫染色を用いて鑑別することが推奨されている¹⁾。当院の免疫染色については以前より腺癌のマーカーであるTTF-1を使用していたが、今回扁平上皮癌のマーカーとして高い特異性と感度を示すp40も実施項目として採用した。p40免疫染色導入後、細胞診での推定病変と免疫染色後の組織診断に不一致例があ

ることが判明したため、導入後の7症例について細胞学的に再検討を行った。

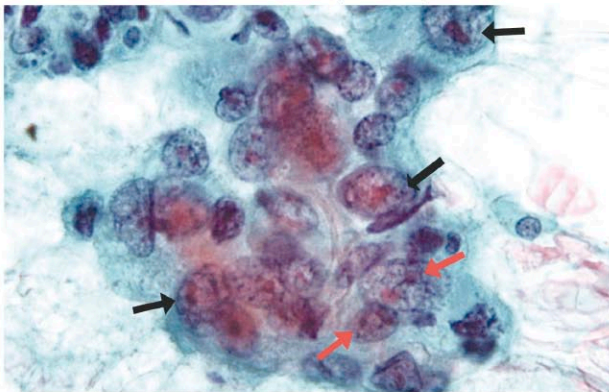
I. 対象および方法

p40を導入した2015年12月以降の症例から細胞診で腺癌と扁平上皮癌の鑑別に苦慮した症例および細胞診と組織診で組織型が異なった症例、計7例を対象とした。細胞診材料は腫瘍捺印、気管支擦過、気管支洗浄液および喀痰であり、組織診材料は切除標本または生検である。

細胞所見の観察は肺癌取扱い規約第7版に掲載されている肺癌細胞型分類 (1985改訂)²⁾ を基に①細胞の配列、②細胞の形、③核の位置、④核形、⑤核小体の形、⑥核小体の大きさ、⑦核小体の色調、⑧核小体の数、⑨その他の特徴所見の計9項目とした。細胞診材料が気管支擦過などの新鮮材料であるため、似通った所見となり得る細胞質および核クロ

マチンの性状については今回の検討項目から除外した。核小体は円・類円形または不整形に分類し、悪性細胞200カウント中の割合を算出した。核小体が不明瞭な細胞が多い、または悪性細胞の出現細胞数が少ないなど200カウントに達しない症例については100カウントまたは可能な限りの細胞数をカウントした。円・類円形および不整形の基準となる形態をFigure 1に示す。免疫染色の一次抗体にはニチレイのヒストファインTTF-1 (SPT24)、p40 (BC28)を用い、ともにDAKOのTarget Retrieval Solution, pH9 (10x) でマイクロウェーブ処理を行った。

Figure 1
核小体の形態 (case 5)

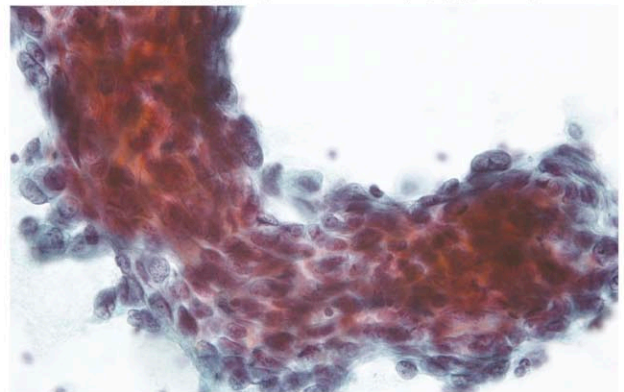


円・類円形 (赤矢印)、不整形 (黒矢印)

II. 結果

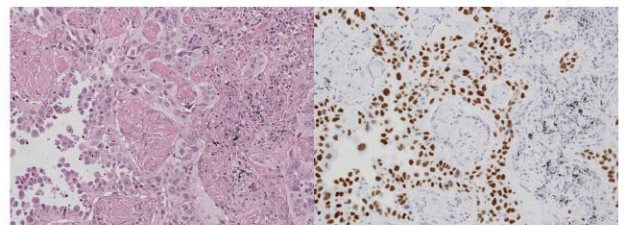
各症例の年齢・性別、細胞診材料の種類および組織診材料での免疫染色結果をTable 1に、細胞所見を再検討した結果および組織診での最終診断をTable 2に示す。細胞診で明らかな腺癌と考えた症例①、②については組織材料での免疫染色でもTTF-1陽性、p40陰性となり腺癌を支持する結果

Figure 2
腫瘍捺印細胞像 (case 3 : Pap. 対物×40)



核の長軸方向への流れ様配列を示す細胞集塊。

Figure 3
切除組織像 (case 3 : 左HE 右TTF-1 対物×20)



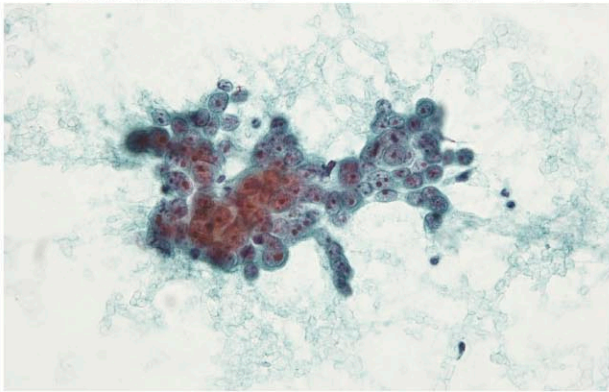
豊富な好酸性胞体を有する大型異型細胞の増生と肺胞置換性増生を示す。いずれもTTF-1 (+) であった。

であったが、生検の形態は腺癌に典型的なものではなかった。細胞診で扁平上皮癌と考えた症例③ (Figure 2) ではp40陰性、TTF-1陽性となり、腺癌を支持する結果となった (Figure 3)。一方細胞診で腺癌をより強く疑った症例④ (Figure 4) ではp40陽性、TTF-1陰性となり、組織診では扁平上皮癌と診断された (Figure 5)。細胞診、組織診ともに鑑別に難渋した症例⑤、⑥については免疫染色結果を踏まえ、それぞれ扁平上皮癌、腺癌と診断された。細胞診、組織診ともに扁平上皮癌を疑った症例⑦ではp40陰性、TTF-1陰性、CK (AE1/AE3) 陽

Table 1 細胞診材料の種類および組織診材料での免疫染色結果

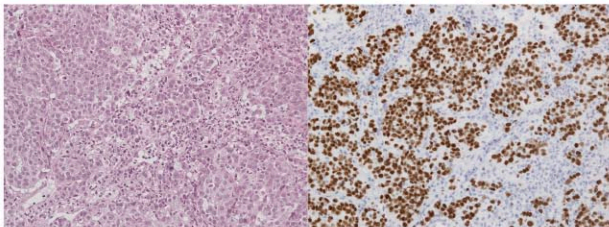
症例 No.	年齢・性別	細胞診材料	組織診材料	細胞診推定病変	組織診断 (免疫染色前)	p40	TTF-1
①	82F	気管支擦過	生 検	腺癌	腺癌疑い	陰性	陽性
②	75M	気管支洗浄液	生 検	腺癌	非小細胞癌	陰性	陽性
③	63M	肺腫瘍捺印	肺切除	非角化型扁平上皮癌	低分化型腺癌	陰性	陽性
④	81M	喀 痰	生 検	異型腺上皮細胞	低分化型扁平上皮癌	陽性	陰性
		気管支擦過		腺癌			
⑤	70M	気管支擦過	生 検	非角化型扁平上皮癌+大細胞癌	扁平上皮癌疑い	陽性	陰性
⑥	83M	気管支洗浄液	生 検	悪性細胞 (+)	低分化型腺癌疑い	陰性	陽性
⑦	67M	気管支洗浄液	生 検	扁平上皮癌または大細胞癌	扁平上皮癌または大細胞癌	陰性	陰性

Figure 4
気管支擦過細胞像 (case 4 : Pap. 対物×40)



類円形かつ好酸性の大型核小体が目立つ細胞集塊。

Figure 5
生検組織像 (case 4 : 左HE 右p40 対物×20)



シート状に増生する異型細胞。p40 (+) であった。

性となった。TTF-1陰性の低分化型腺癌の存在が報告されており³⁾ 鑑別には挙げられたが、PAS反応陽性となる粘液産生所見が見られず、形態学的に多形性を示す核と好酸性胞体を有する大型異型細胞

の増生や奇異な核を有する紡錘形細胞が見られたことから低分化型扁平上皮癌または大細胞癌と診断された。Table 2より細胞所見を見ると、腺癌であった症例①②③⑥では核は偏在傾向、類円形～楕円形で立体的な核形不整が強い細胞が多かったが、細胞の配列・形については様々であった。核小体は好酸性かつ円形のものが多かったが不整形も5%程度は出現しており、症例⑥については悪性細胞の出現細胞数が少なかったものの不整形が半数近く出現していた。扁平上皮癌であった症例④⑤⑦では比較的平面的な細胞配列で、核小体は多発傾向かつ不整形なものが13.5～49.0%と比較的多く出現していたが、細胞の形、核の位置・形に規則性はみられなかった。

III. 考 察

p40がこれまで用いられてきたp63, CK5/6に比べ扁平上皮癌のより特異性の高いマーカーとされてから³⁾ 扁平上皮癌と腺癌の組織型の鑑別が明確になる頻度は高くなったが、その中で従来の細胞所見の捉え方では細胞型の判定を誤ってしまう症例があることも報告されている³⁾。当院でも呼吸器領域

Table 2 細胞所見を再検討した結果および組織診での最終診断

項目 症例No.	細胞		核		核小体				その他の特徴所見	最終診断
	配列	形	位置	形	形(円/不整)	大きさ	色 調	数		
①	立体的	類円形	偏在性	類円形	円 (87/13) 円 93.5%	中	好酸性	1個	乳頭状集塊。 腺腔様配列は不明瞭。	A
②	立体的	類円形	偏在性	類円形/ 立体不整強い	円 (96/4) 円 96.0%	小	好酸性	1～2個	淡明な細胞質。	A
③	平面的>立体的	紡錘形>大型 奇異>類円形	中心性>偏在性	類円形・楕円形/ 立体不整あり	円 (191/9) 円 95.5%	小	好塩基性	1～2個	流れ様配列が目立つ。 大型集塊内に腺腔様?配列あり。 単個での出現は少ない。	A
④-1	平面的	類円形・ 立方形	中心性>偏在性	類円形/立体感 少しあり	円 (173/27) 円 86.5% 不整13.5%	大	好酸性	1個	N/C高く、核位置が不明瞭。 不整形な核小体があるが割合的には低そう。 細胞相互封入像が目立つ。 核縁の肥厚のみで核クロマチンの濃染はないように見えた。	S
④-2	平面的	類円形・ 立方形	中心性>偏在性	類円形	円>不整 (141/59) 円70.5% 不整29.5%	大	好酸性	1～2個 >4個以上	硬癌様の線状配列あり。 細胞相互封入像が目立つ。 濃縮核が混じる。 核分裂像(+)	
⑤	平面的<立体的	類円形・ 紡錘形・奇異	中心性<偏在性	類円形・ジャガイ モ状/立体感あり	円・不整 (102/98) 不整49.0%	中～大	好酸性	4個以上	壊死背景。 濃縮核が混じる。 核クロマチン粗い。	S
⑥	ほぼ単個	楕円形、 一部紡錘形	偏在性	類円形・楕円形/ 立体感ややあり	円・不整 (5/3) 不整37.5%	中	好酸性	1個	出現細胞少数。	A
⑦	平面的	類円形・多辺 形・紡錘形	中心性<偏在性	類円形・ジャガイ モ状/立体感なし	不整 (58/42) 不整42.0%	中	好酸性	2～3個	壊死背景。	S

A:adenocarcinoma
S:squamous cell carcinoma

全体の症例数がそれほど多くないにも関わらず同様の事象を経験した。従来の判定基準では、腺癌は立体的な細胞配列で細胞の形は円または楕円形、細胞質は豊富で淡明または空胞状、核は偏在性で大型円形の好酸性核小体が1個みられ、しばしば腺腔様配列を示す、とされている^{2) 4)}。また非角化型扁平上皮癌では敷石状の平面的な細胞配列で細胞の形は類円形～多边形、核は中心性で不整形な核小体が認められ、濃縮核も見られる、とされている^{2) 4)}。しかし、今回の検討結果からは細胞配列・形、核の位置に規則性はなかった。一方、核の立体的な核形不整の有無、不整形核小体の割合にはある程度の規則性があるように思われた。

推定組織型が異なった症例③④について見てみると、症例③では比較的平面的で流れ様配列を示す集塊が目立ったため非角化型扁平上皮癌を考えたが、核の立体不整が強い点は腺癌を支持する重要所見である⁵⁾とされていることを鑑みると、核所見からは腺癌を考慮すべきであった。症例④は平面的な配列ではあるものの、好酸性かつ大型類円形の核小体や細胞相互封入像が目立ったため腺癌を考えたが、気管支擦過後のブラシ洗浄液（RPMI1640培地：ナカライテスク）では不整形核小体も見られた。一般的にブラシ洗浄液では液状化による細胞変性に加わり、核は肥大し、核内が透けてみえてしまうため核クロマチンの増量については確認しづらいが、核内構造は明瞭化するため核小体の形状は観察しやすくなるといわれている。異型細胞はN/Cが高く、核の位置については偏在傾向が確認できなかったが、不整形核小体が目立つ点や濃縮核の混在は扁平上皮癌を考慮すべき所見であった。

細胞診で典型的な腺癌であると考えた症例①②は、生検標本に見られた異型細胞が少量かつ断片化しており、腺癌を推定するもののHE所見のみでは確定診断に至らなかった。このような場合は積極的に免疫染色が活用されるべきであろうと思われる。肺癌は依然、進行癌で発見されることが多く、組織検体は生検に留まることも少なくない。しかし生検では異型細胞数が少ない場合がある。また挫滅によ

る変性加わることもあり、特に小細胞癌のような裸核状の細胞の場合、個々の形態を観察するのは困難であることも多い⁶⁾。その点、細胞診標本では細胞個々の本来の形態を捉えやすい。また、生検では大きな腫瘍の部分像を見ているにすぎないことも念頭に置く必要がある⁷⁾。肺腺癌はmixed subtypeの傾向にあることも特徴の一つで⁸⁾必ずしも気管支擦過・気管支洗浄液と生検で同じ異型細胞を見ているとは言い切れないと思われる。

鑑別が困難であった症例⑥については、悪性とは判定できるものの異型細胞の細胞数が少なく細胞変性も強かったため組織型の推定が困難であった。細胞の形は楕円形のものやや優位で紡錘形のものも見られた。生検材料ではこの紡錘形細胞の他に類円形細胞も見られ、後者は腺癌を疑う所見であったようにも思われた。

細胞診、組織診とも扁平上皮癌を疑った症例⑦は免疫染色でも異型細胞にはp40陽性所見が得られなかったが形態学的所見を重視し扁平上皮癌と診断された。Internal controlとなる基底細胞と円柱上皮細胞はそれぞれp40, TTF-1陽性であった。p40, TTF-1とも“癌細胞”に特異的な抗体ではないため、免疫染色を実施する前に対象となる異型細胞の良性・悪性の判定は形態学的になされる必要がある。

組織型別の好発部位は扁平上皮癌が肺門部（中枢側）、腺癌が肺野部（末梢側）であるが、近年、末梢型の扁平上皮癌が増加傾向にあり、その細胞像は腺癌に類似すると言われている⁹⁾。しかし症例④は中枢側発生の扁平上皮癌であったが腺癌を思わせる細胞像を呈していた。非角化型扁平上皮癌は、中枢型でも腺癌との鑑別を要する場合があると考えられた。

木村、下里らによって提唱された肺腺癌の細胞重型分類によると、低分化型腺癌を除く高～中分化型腺癌は①気管支表面上皮型（粘液非産生）、②気管支表面上皮型（粘液産生）、③気管支腺型、④Clara細胞型、⑤2型肺胞上皮細胞型に分類される⁸⁾。この分類を用いると、非角化型扁平上皮癌との鑑別を要する腺癌は、粘液産生が明らかでなく、かつ細

胞の形が立方形～低円柱状のClara細胞型であると思われる。Clara細胞型は肺胞置換性増殖をするが、この癌細胞が化生性変化を伴った部分を見た場合に特に注意が必要である。今回検討した症例③では、腫瘍中心部の捺印細胞診を行った。切除標本の組織像でもこの部分の形態は扁平上皮癌と思われたが腫瘍外側部で肺胞置換性増殖が見られたため腺癌の混在も考慮し免疫組織化学的検査が行われた。その結果、中心部・外側部ともp40陰性、TTF-1陽性であり、最終的に腺癌と診断された。今回の検討結果を踏まえ、腺癌、非角化型扁平上皮癌の細胞診判定基準は従来よりも若干範囲を広げることが必要だと考えられた。即ち、腺癌、非角化型扁平上皮癌の細胞所見の一部はoverlapさせ、各細胞型の1所見のみを重視するのではなく、細胞質、核所見を総合的に判定することが重要であり、どちらかに典型的でない所見が認められた場合は免疫染色で確認することが望ましいと考えられた。

IV. 結語

p40を用いることにより腺癌と非角化型扁平上皮癌の鑑別は以前より明確になることが多くなったが、同時に細胞診での推定病変と組織診断が異なる症例も経験するようになった。扁平上皮癌に特徴的とされた“流れ様配列”は単独で扁平上皮癌を支持する所見とはなり得ず、核所見も十分に加味する必要があると思われた。また核の立体不整は扁平上皮癌には見られにくく腺癌を支持する所見であると考えられた。これまでのcriteriaを大きく崩すことなく新たに明らかになった重要視すべき細胞所見を考慮し、慎重に判定することが重要であると再認識した。

■文献

- 1) Travis WD et al.: “WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart,” IARC, Lyon, 2015
- 2) 日本肺癌学会：「成績の報告と細胞判定基準」, 肺癌取扱い規約第7版, 121-122, 金原出版, 東京, 2010
- 3) 谷田部 恭, 他：「腫瘍の鑑別に用いられる抗体」, 病理と臨床2014 vol.32 臨時増刊号 免疫組織化学 診断と治療選択の指針, 139-143, 文光堂, 東京, 2014
- 4) Thomas E.Giles et al.: “DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY THIRD EDITION” , 60-73, Winifred Gray, Gabrijela Kocjan (eds.) , CHURCHILL LIVING STONE, London, 2010
- 5) 舟橋光政, 他：「実践的な細胞診の見方」, 実用細胞診トレーニング, 60-75, 秀潤社, 東京, 2008
- 6) 武島幸男, 他：「非角化型扁平上皮癌の診断と鑑別（生検および切除組織）」, 病理と臨床2016 vol.34 No.4, 332-339, 文光堂, 東京, 2016
- 7) 谷田部 恭：「生検組織の扱い」, 病理と臨床2016 vol.34 No.3, 244-248, 文光堂, 東京, 2016
- 8) 野口雅之：「VI.悪性腫瘍 腺癌」, 腫瘍鑑別診断アトラス 肺, 86-103, 文光堂, 東京, 1996
- 9) 竹中明美：「呼吸器末梢性扁平上皮癌の細胞像」, スキルアップサイトロジー シリーズ33, 8-13, 武藤化学株式会社, 東京, 2010

Cytological re-examination for non-small cell lung carcinoma after the introduction of immunostaining for p40

Akiko YOSHIDA ¹⁾ Shinji UMANO ¹⁾ Noriyuki SUEYOSHI ¹⁾
Shizuki TAKEMURA ¹⁾²⁾

1) Department of Clinical Laboratory,
Japan Community Health care Organization Shiga Hospital
(16-1, Fujimi-dai, Otsu-shi, Shiga 520-0846, Japan)

2) Shizuki Pathology Clinic

Summary

Non-small cell carcinoma of the lung is classified as adenocarcinoma or squamous cell carcinoma. We introduce anew immunostaining for p40 that is a marker of squamous cell carcinoma, because distinguishing the two types of carcinomas might be difficult in certain cases. We came across some cases where the cytological diagnosis was different from the final pathological diagnosis. Thus, we reexamined seven cases from a cytological perspective.

One case that had tumor cells with characteristic cytological finding of “sequence like a flow” using the touch technique in cytological analysis was diagnosed as squamous cell carcinoma. However, these tumor cells were immunohistochemically positive for TTF-1 and negative for p40, which supported the pathological diagnosis of adenocarcinoma. Another case had tumor cells with the following cytological findings: oval shape, marginally three-dimensional impression and acidophilic nuclei, and large oval nucleoli. This case was considered adenocarcinoma based on the result of the cytological analysis using the rub technique. However, the cells were immunohistochemically positive for p40 and negative for TTF-1, which supported the pathological diagnosis of squamous cell carcinoma.

By introducing the use of p40 immunostaining, histological types could be determined more accurately in cases where distinguishing between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma was difficult or in cases diagnosed as only non-small cell carcinoma. Therefore, immunostaining for p40 provides an opportunity to reconsider cytological findings judged as characteristic of the respective cytological types. More-careful observation is required for cytological judgment, and it seems that it may be necessary to use immunostaining on such occasions of difficulty in diagnosis of carcinoma.

(Received November 30, 2016; Accepted; January 18, 2017)