

— 原 著 —

## 病理組織診断における種々の補助診断 技術の応用について

長 沼 廣, 一 迫 玲\*, 沢 井 高 志\*  
手 塚 文 明\*\*, 佐 藤 真 一, 村 山 晴 喜  
湯 田 浩 司, 望 月 静 枝\*

### はじめに

病理組織診断の多くはホルマリン固定, パラフィン薄切切片, ヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色で行なわれる。一般に悪性の判定に関しては, 従来の組織標本で充分であるが, 腫瘍の組織発生に関しては, 免疫染色による補助診断が決め手に成る事が多い。当院病理科でも種々の免疫染色を施し, 診断の手助けにしている。しかし, 免疫染色やその他の光学顕微鏡 (光顕) 用の特殊染色だけでは十分な診断を得られない場合があり, そのような時には電子顕微鏡 (電顕) 検索, フローサイトメトリーによる検索, 遺伝子検索が重要な診断根拠を与えてくれる。これまで私どもが院内で経験した, いろいろな補助診断の組合せが診断の役にたった事例を提示し, 現在の病理診断の進歩について若干報告したい。

### 症 例

#### 1. 電顕検索が特殊な疾患を示唆した例 (Fabry 病)

症例: 57 歳, 女性

主訴: 動悸

家族歴: 父は胃癌で死亡, 母は健在だが, 狭心症があり, 姉 1 人, 妹 2 人, 弟 2 人, 息子, 娘 1 人は皆健康である。

既往歴: 35 歳時に甲状腺機能亢進症, 38 歳時に

子宮筋腫の手術を受けた。

**現病歴:** 1972 年頃より年 4~5 回数時間持続する心悸亢進発作が出現。1984 年検診で心電図異常を指摘され, 当院循環器科受診, 心臓超音波検査で肥大型心筋症と診断され, 以後外来通院していた。1987 年心房細動が出現し, 以後抗不整脈剤を投与されたが, 1992 年から発作が頻発したため, 薬効評価および原疾患確定のため入院となった。入院後, 心臓カテーテル検査により右室心房の生検を行なった。

**病理組織:** 採取された心筋組織では, 心筋線維内に多数の空胞を認めたが, 心筋の disarray, 大小不同は見られなかった (図 1)。電顕的には心筋線維内に多数の脂質封入体を認め (図 2), これらは規則正しく同心円状に幾層にも重なる構造物を示していた (図 3)。これは Fabry 病に特徴的な所見であった。

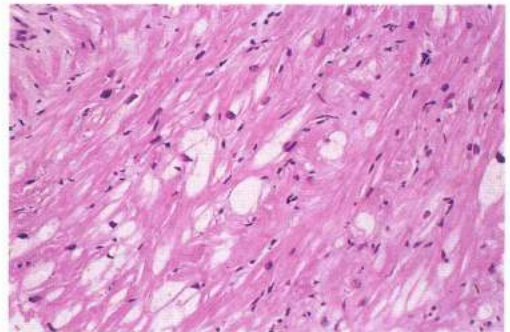


図 1. 右室心筋生検像。心筋線維間に多数の空胞が認められる。Hematoxylin-Eosin (HE) 染色 (中等度拡大)

仙台市立病院病理科

\* 東北大学医学部付属病院病理部

\*\* 東北大学抗酸菌研究所病理

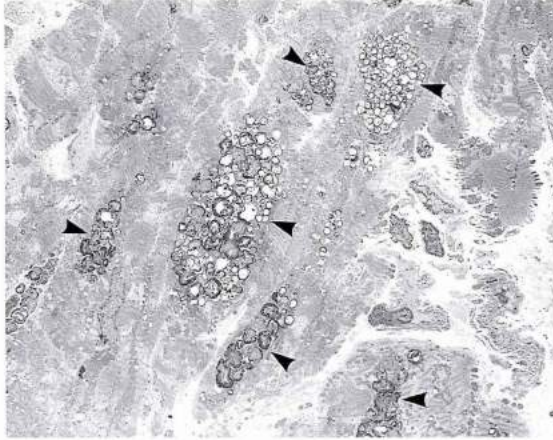


図2. 心筋電顕像。心筋線維内に多数の脂質封入体(矢印)を見る。×1,600



図3. 脂質封入体拡大像。規則正しい同心円状構造物を示す。×100,000

## 2. 免疫染色より電顕検索が最終診断に役立った例 (Histiocytosis X)

症例：3歳，男児

主訴：食欲低下

家族歴，既往歴：特記すべき事なし

現病歴：1991年8月頃より食欲低下し，柔らかい物しか食べなくなった。寝汗も目立つようになり，9月当院小児科を受診した。歯肉の腫張と口腔内の多発性潰瘍と指摘され，歯科受診となった。歯科では潰瘍性歯肉炎と診断された他に，下顎骨の著明な骨吸収像および浮動歯を指摘された。肝機能障害も指摘され，入院となった。

入院時現症：前胸部に出血を伴った小発疹が散在していた。肝は3横指触知し，頸部リンパ節腫脹を認めた。

悪性腫瘍を疑い，歯肉腫脹部から生検を行なった。

病理組織：採取された歯肉組織では炎症性細胞浸潤，壊死を認めたが，その中に比較的胞体が豊かで核異型を見る腫瘍細胞の浸潤性増殖を見た(図4)。種々の免疫染色を施したが，S-100染色が陽性であった(図5)以外は特徴的所見は得られなかった。電顕的に腫瘍細胞は多数の小胞体を持ち，ミトコンドリアの少ない胞体を持つ細胞であった

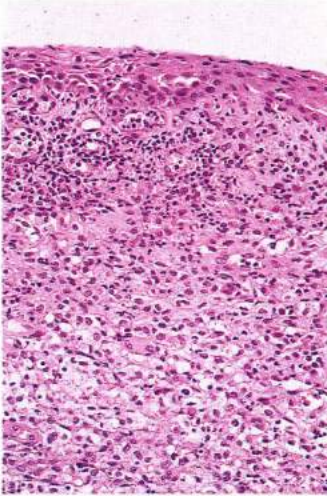


図4. 歯肉生検組織像。扁平上皮に覆われた組織で、上皮下に炎症性細胞浸潤と共に胞体の豊かな腫瘍細胞の増殖を見る。HE染色（中等度拡大）

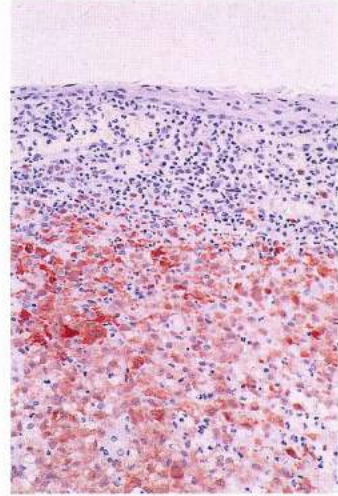


図5. 歯肉生検組織における抗s-100抗体による免疫染色像。図4で示した腫瘍細胞がs-100陽性像を示す。

が、胞体内に多数の Birbeck 顆粒を認めた(図6)。これらの所見から histiocytosis X (Letterer-Siwe disease) と診断した。

### 3. 免疫染色，電顕検索が診断根拠となった例 (Endometrial stromal tumor)

症例：44歳，女性

主訴：不正性器出血

家族歴，既往歴：特記すべき事なし

**現病歴：**人工妊娠中絶後，ピルを服用したところ不正性器出血が見られ，精査の結果血管内皮腫の疑いもたれ，当院婦人科を受診し，子宮全摘術を受けた。

**病理組織：**摘出された子宮では子宮筋層から内腔に突出する白色の腫瘍が見られ，比較的境界は鮮明であった(図7)。

腫瘍細胞は紡錘形細胞の増殖から成り，血管を

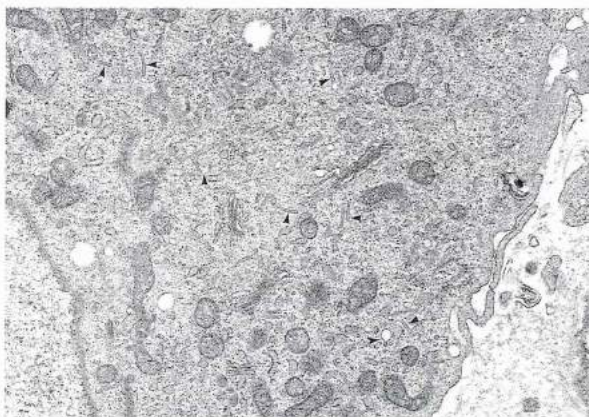


図6. 腫瘍細胞電顕像。ミトコンドリアは少ないが，多数の小胞体と共に多数の Birbeck 顆粒(矢印)を見る。×20,000



図7. 摘出子宮肉眼像。子宮内腔に突出する約3×3 cmの白色の腫瘤を見る。

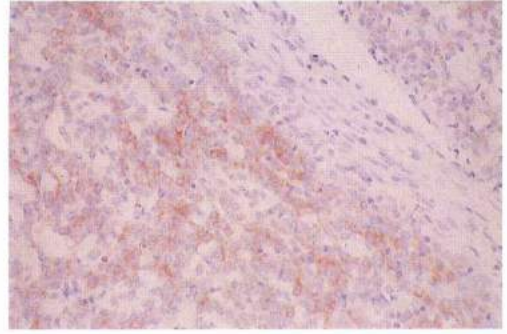


図10. 腫瘍細胞の抗サイトケラチン抗体による免疫染色像。紡錘形の腫瘍細胞の胞体にサイトケラチン陽性像を認める。

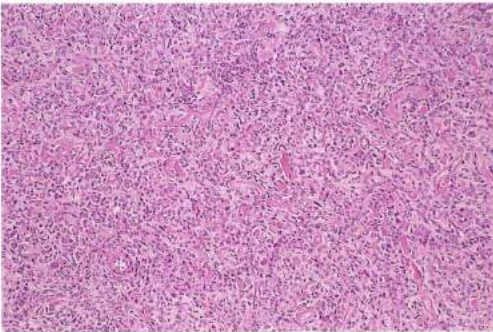


図8. 腫瘍組織像。紡錘形の腫瘍細胞が束状あるいは渦状に配列し増殖している。血管の周りや間質に硝子様物質の沈着を認める。HE染色(弱拡大)

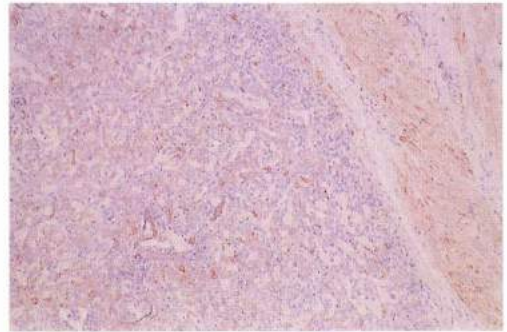


図11. 腫瘍細胞の抗デスミン抗体による免疫染色像。サイトケラチン陽性細胞が同時にデスミン陽性像を示す。

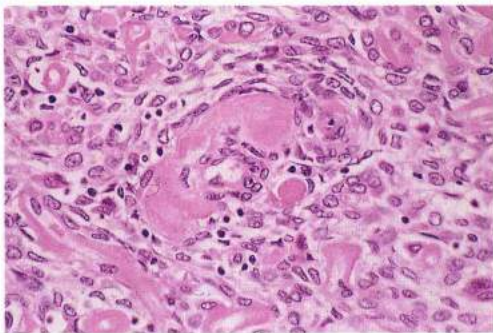


図9. 強拡大像。血管周囲の硝子様沈着物質。HE染色

中心とした硝子様物質を多数認めた(図8, 図9)。免疫染色を施した所, 上皮系のマーカーであるサイトケラチンが陽性(図10), 間葉系マーカーであるビメンチンはほぼ陰性であったが, 筋系マーカーのデスミンが陽性(図11)であった。血管系マーカーは陰性であった。電顕的には腫瘍細胞は多数の細胞突起を持ち, 個々の細胞間には desmosome あるいは desmosome like structure を認めた(図12)。

これらの性格を持つ腫瘍細胞として endometrial stromal tumor が最も考えられた。

#### 4. 免疫染色よりフローサイトメトリーが診断根拠となった例 (small cell carcinoma, lung)

症例: 55歳, 女性

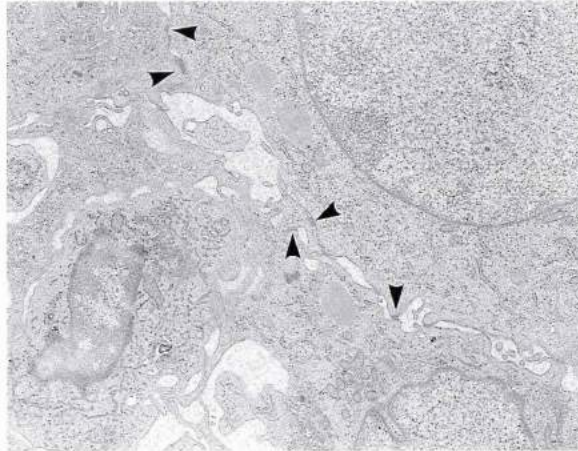


図12. 腫瘍細胞電顕像。腫瘍細胞は多数の細胞突起を持ち、個々の細胞間には矢印の如く desmosome 或いは desmosome like structure を多数認める。×7,000

**主訴:** 頸部腫瘍

**家族歴, 既往歴:** 特記すべき事なし

**現病歴:** 1992年8月に左頸部腫瘍に気づき、来院。吸引細胞診にて悪性リンパ腫の疑いとなったため、精査目的で生検が施行された。胸部レ線では縦隔部に異常陰影が認められた。

**病理診断:** 摘出されたリンパ節には小型の異型の強い腫瘍細胞も浸潤増殖が見られ、一部は単離性増殖を示し、一部は上皮様の配列を示していた(図13)。上皮性、非上皮性を鑑別するためパラフィン切片で免疫染色を施したが、上皮系のマ

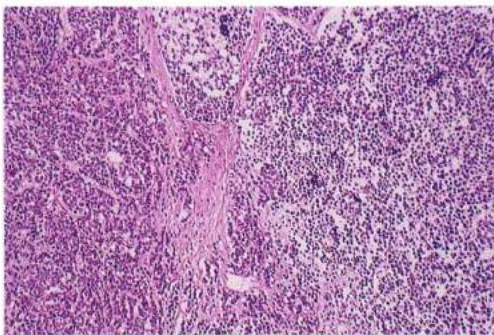


図13. 生検リンパ節組織像。リンパ節内の腫瘍細胞は一部は単離しながら浸潤増殖し、一部は上皮様配列をして増殖している。HE染色(中等度拡大)

ーカーであるサイトケラチン陰性、間葉系のマーカーであるヴィメンチン陰性、リンパ球系のマーカーであるLCAも陰性であり、腫瘍細胞の性格を同定することが出来なかった。電顕的には細胞接着は密であるが、desmosomeはそれほど発達していない。未固定組織のフローサイトメトリー検査ではリンパ球系のマーカーはすべて陰性であったが、上皮系マーカーのEMAが陽性になった。以上のデータから small cell carcinoma が考えられ、縦隔の異常陰影を認めることから肺癌の転移と診断した。

#### 5. フローサイトメトリーより凍結切片における免疫染色が決め手となった例 (Ki-1 lymphoma)

**症例:** 14歳、女兒

**主訴:** 発熱、頸部リンパ節腫張

**既往歴, 家族歴:** 特記すべき事なし

**現病歴:** 1991年11月発熱、頭痛、咳出現し、その後、顎下部、頸部リンパ節が腫張し、腋窩リンパ節が手拳大まで腫張したが、これは自然に消失した。12月になり、鼻出血、前頸部痛、右眼瞼下垂、右瞳孔散大、悪心、頭痛も出現したため、入院となった。

入院後、頸部リンパ節の生検を行なった。

**病理組織:** 採取されたリンパ節ではほぼ基本構

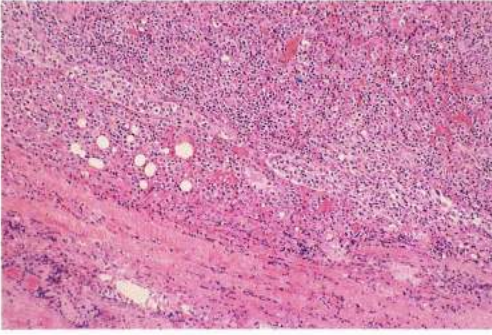


図 14. 生検リンパ節組織像。正常のリンパ濾胞構造が乱れ、類洞に沿ってやや大型の細胞の増殖を見る。HE 染色（中等度拡大）

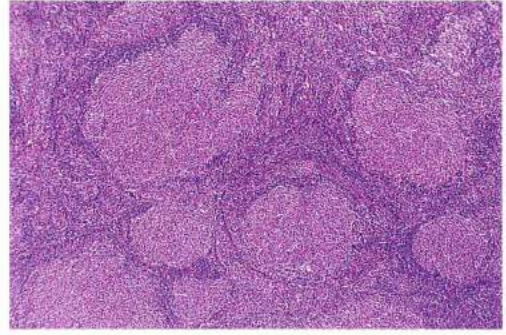


図 16. 腋窩リンパ節組織像。大小の濾胞と濾胞の融合が見られ、濾胞性リンパ腫の像である。HE 染色（中等度拡大）



図 15. 腫瘍細胞の抗 Ki-1 抗体による免疫染色像。腫瘍細胞と考えられる細胞が Ki-1 陽性である。（弱拡大）

造は維持されていたが、一部構造の乱れがあり、この部にやや大型の異型リンパ球の増殖を認めた（図 14）。新鮮材料でのフローサイトメトリーでは T 細胞、B 細胞が混在するパターンで、反応性の病変も否定できなかったが、凍結切片を用いた免疫染色ではこの部の異型リンパ球に Ki-1 陽性像を認めた（図 15）。これにより Anaplastic large cell lymphoma (Ki-1 lymphoma) と診断された。

#### 6. 遺伝子検索が決め手となった例（濾胞性リンパ腫）

症例：48 歳、女性

主訴：腋窩リンパ節腫張

家族歴、既往歴：特記すべき事なし

現病歴：1992 年 6 月に右腋窩に約 3 cm の腫瘤を触知し、その他項頸部、両側頸下部、両側鼠径

部にも柔らかい腫瘤を触知した。悪性リンパ腫を疑い、精査目的で生検した。

**病理組織：**腋窩リンパ節では大小不同のろ胞を認め、一部ろ胞の融合を認めた。ろ胞は異型のリンパ球からなり、Mantle zone も消失している事から濾胞性リンパ腫とした（図 16）。採取されたリンパ節はすべてホルマリン固定されていたため、詳細なマーカー検索のための、鼠径部のリンパ節生検を更に行なった。鼠径部のリンパ節ではやや構造の乱れはあるもののはっきりとしたリンパ腫の像はなく、反応性の病変も考えられ、フローサイトメトリーでも必ずしも細胞増殖の monoclonarity を証明出来なかった。ところが、同時に行なった遺伝子検索では免疫グロブリンの重鎖と入鎖の遺伝子再構成があり、更に濾胞性リンパ腫に特徴的な bcl-2 の遺伝子再構成も認められ、このリンパ節も濾胞性リンパ節と判断された。

#### 考 察

病理組織診断にはホルマリン固定、パラフィン薄切片を用いるのが基本である。しかし、近年臨床診断技術の進歩に伴い、境界病変や前癌病変を的確に診断することが求められることが増えている。更に、明らかに悪性と分かる病変についても治療効果や予後の判定に役立つ情報やコメントが求められ、また、良性病変でも本体を解明する詳細な答えを用意しなければならなくなって来ている。そのため病理側では、組織切片において種々

の染色方法を効率よく、かつ信頼がおけるように組合せて診断しなければならない。また、全く別の手法による解析を加える必要もでてきた。研究途上にある様々な分析法の中でほぼ確立された診断技術を私どもの病院でもどんどん取入れなければならない時代になった。

現在、一般病院でも行なえる検索としては、通常の光顕標本検索の他に、電顕検索、免疫染色、細胞浮遊液を用いたフローサイトメトリー、染色体検査、遺伝子検索などがある。電顕検索では細胞内の小器官の微細な構造、細胞間の結合の状態を詳細に観察出来る。免疫染色では抗原抗体反応の他にレクチンと糖鎖の反応、ホルモンとリセプターの反応など種々の結合反応により、分子の細胞内局在、膜蛋白の状態が把握できる。更に、フローサイトメトリーでは細胞浮遊液を用いてDNA aneuploidy の検索や腫瘍マーカーを含む細胞表面抗原の検索が行なえる<sup>1)</sup>。染色体検査はこれまで先天異常の検索によく用いられてきたが、最近では腫瘍との関連で研究が盛んである<sup>2-4)</sup>。すなわち、腫瘍の発生源となる組織の機能又は増殖を担う遺伝子と関連する初発変異および腫瘍の悪性度をより増幅させるものと関連した持続変異に関わる染色体転座の有無を見ることが診断の手助けになる<sup>4-6)</sup>。また、最近進歩した遺伝子検索では腫瘍遺伝子 (oncogene) の検索<sup>7)</sup>と共に、悪性リンパ腫の様に遺伝子再構成を見ることがにより、B細胞系腫瘍かT細胞系腫瘍かをより確実に判定でき、かつ早期ないしより少数の腫瘍性病変を見つかることも出来る<sup>8-10)</sup>。

通常の診断に用いる光顕検索では採取組織を10%ホルマリンで固定すれば良いが、前述の他の検索を行なうためには採取組織の取扱いにおいて様々な対応が必要となる。

すなわち、

- 1) 電顕検索では組織を採取後直ちに細切し、電顕固定液に入れて、固定しなければならない。
- 2) 一部の免疫染色については凍結ないし特殊な固定液を用いた固定をしなければならない。
- 3) フローサイトメトリー用の細胞浮遊液を作製するためには固定前の新鮮組織が必要である。

4) 染色体検査では細胞培養をするため検体を無菌的に扱わなければならない。

5) 遺伝子検索では新鮮組織ないし瞬時に凍結した組織が必要である。

なぜこれだけ面倒な方法を使わなければならないのであろうか。

症例1の様に光顕上観察された心筋線維間の脂質封入体も、電顕上、規則正しい同心円状の特殊構造物であることが確認されてはじめてFabry病が強く疑われ、心筋症の原因を同定できるものである<sup>11,12)</sup>。この症例の場合、末梢白血球の $\alpha$ -galactosidase活性の低下が見られなかったため、Fabry病の確定は得られていない。しかし、女性のFabry病では軽症のことがあり<sup>12)</sup>、今後の詳しい検索も必要になる。現在、盛んに用いられている免疫染色でも抗原の安定性、抗原の量的問題から陽性、陰性の判定が難しいことがある。症例2の様にマーカー上は組織球と判定されても、電顕上Birbeck顆粒を見出したので診断はより確かなものになった<sup>13,14)</sup>。症例3ではHE標本上は間葉系腫瘍と考えられたが、上皮系のマーカーであるサイトケラチンが陽性であった。これは免疫染色上の非特異的の反応とも考えられたが、電顕上、細胞の突起かつ細胞間の上皮性結合 (desmosome, desmosome like structure) を確認したため、染色結果は確かに特異的の反応であり、腫瘍細胞が上皮様性格を持つと理解された。以上の3例は電顕検索が診断に非常に有用であった例である。

フローサイトメトリーは造血系腫瘍や悪性リンパ腫の診断、マーカー検索に頻繁に使われているが、他の腫瘍の性格を決める為にも有用なことがある<sup>15)</sup>。症例4では10%ホルマリン固定標本の光顕切片の所見が上皮性の腫瘍を強く疑わせたが、パラフィン切片において検索したマーカーがいずれも陰性で腫瘍細胞の性格を同定することが出来なかった。しかし、新鮮材料によるフローサイトメトリーで上皮性の性格を見出したことで診断が確実にされた。

悪性リンパ腫においては通常固定標本を用いた免疫染色の他に、凍結切片を用いた免疫染色、新鮮材料を用いたフローサイトメトリーがマーカー

検索に有用であり<sup>15,16)</sup>、最近ではほぼ全例にこの検査を施行している。フローサイトメトリーは細胞膜表面抗原の検索には強いが、細胞そのものの形態像の把握は出来にくく、わずかな病変の検索には難点がある。症例5はフローサイトメトリーのデータより凍結切片によるマーカー検索が診断根拠となった例である。

また、形態的に腫瘍性変化を見出せなくとも、染色体異常や遺伝子再構成を見ることで早期の診断や少数の悪性細胞の把握が出来ることもある<sup>8-10)</sup>。症例6では遺伝子検索において免疫グロブリンや bcl-2 の再構成を見出し、腫瘍性病変であることが分った。今後はこのように早期の異常病変を遺伝子レベルで診断出来る時代が来る。

当院病理科ではこれらの特殊検索のうち免疫染色以外は東北大学医学部付属病院病理部に依頼しており、相互の連携が診断をより確実なものにしていると考えている。このように症例によっては標本の採取に関してやや面倒な手法を採らなければならない。しかし、種々の補助診断を応用し詳細なデータを得ることにより、治療の方針が立てやすくなり、予後をかなり把握出来るようになる。現在の病理診断の進歩が診療に大きく貢献しているものと確信している。

## 結 語

日常病理診断において、種々の補助診断法を応用することにより、病理診断の精度を高めることが出来るようになった。これらの分析法が次第に一般病院においても普及する時代になり、病理診断もますます多様化してくる。

## 文 献

- 1) 太田和雄 他：フローサイトメトリー—手技と実際、蟹書房、1984.

- 2) 中込弥男 他：細胞遺伝学と病理学、病理と臨床 **5**, 134-139, 1987.
- 3) 広橋説雄 他：腫瘍の分子病理学への展望、病理と臨床 **4**, 10-15, 1986.
- 4) 福原資郎 他：リンパ系腫瘍の染色体異常と病理診断、病理と臨床 **5**, 152-156, 1987.
- 5) 福原資郎 他：染色体分析から見た悪性リンパ増殖性疾患 14q 転座(14q+マーカーの意義)、最新医学 **34**, 1283-1292, 1979.
- 6) 黒木将二 他：悪性リンパ腫の染色体分析、日網会誌 **26**, 61-66, 1981.
- 7) Heldin, C., et al.: Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogene. *Cell* **37**, 9-20, 1984.
- 8) 飛内賢正：DNA 再構成の基礎と悪性リンパ腫診断への応用、臨床と病理 **6**, 725-728, 1988.
- 9) 棚木信男 他：悪性リンパ腫における染色体異常と遺伝子再構成、日本網内系学会誌 **29**, 121-125, 1989.
- 10) 瀬戸加大 他：リンパ腫における bcl-2 遺伝子の役割、臨床血液 **32**, 644-649, 1991.
- 11) Faraggiana, T., et al.: Light and electron microscopic histochemistry of Fabry's disease. *Am. J. Pathol.* **103**, 247-262, 1981.
- 12) Wheeler, C.E. Jr.: び慢性体幹角化血管腫 (Fabry 病)、小坂樹徳監訳、セシル内科学 14 版, p1913-1914, 医学書院.
- 13) Feltkamp, C.A. et al.: A malignant tumor arising from interdigitating cells: Light microscopical, ultrastructural, immuno- and enzyme-histochemical characteristics. *Virchow Arch (A)* **393**, 183-192, 1981.
- 14) Shamoto, M.: Langerhans cell granule in Letterer-Siwe disease: An electron microscopic study. *Cancer* **26**, 1102-1108, 1970.
- 15) 高橋 学 他：フローサイトメトリー、臨床検査 **31**, 1363-1367, 1987.
- 16) 中原一彦：フローサイトメトリーと造血・リンパ組織診断、臨床検査 **31**, 1323, 1987.