

## 当院検査課における 液状化細胞診を利用した免疫細胞化学の導入

高橋 健太<sup>1)</sup> 中屋 佳子<sup>1)</sup> 渡邊 和則<sup>1)</sup> 河原 栄<sup>2)</sup>

**要 旨**：免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) は時に腫瘍診断に欠かせない手法だが、IHC を細胞診に応用した免疫細胞化学 (immunocytochemistry, ICC) も同様に細胞診の精度を上げることが知られている。当院における ICC 導入のため、液状化細胞診 (liquid-based cytology, LBC) を利用し、7 種の抗体に対して、一次抗体希釈倍率、抗体反応時間と非特異的タンパク阻害の有無の条件を変えて染色し、最適条件を検討した。良好な抗体希釈倍率は、どの抗体も 1 倍または 5 倍で、最適抗体反応時間は 5 分から 30 分と、抗体による差が大きかったが、全ての抗体で 1 倍の希釈と 30 分の抗体反応時間で良好に染まった。抗原賦活は IHC と異なり ICC では不要な抗体が多かったが、p53 と TTF-1 では必要であった。また、非特異的タンパク吸着阻害は必要なかった。

**【Key words】 immunocytochemistry, liquid-based cytology**

### 緒 言

免疫組織化学 (Immunohistochemistry, IHC) は抗原抗体反応を利用して組織内の蛋白質を検出・可視化する手法である。病理組織診において悪性腫瘍の組織型の推定、悪性度評価または治療薬の選択などに不可欠な手法である。免疫細胞化学 (Immunocytochemistry, ICC) は IHC を細胞診に応用したもので細胞診の精度を上げることが報告されている<sup>1, 2)</sup>。既に細胞診が施行されている患者で追加の生検検体採取が難しい場合や、胸腹水などの液状検体等で組織切片が利用できない状況において ICC は非常に有効である。さらに、近年の子宮頸部擦過細胞診において普及してきた液状化細胞診 (Liquid-based cytology; LBC) は細胞を専用液に回収したのち、細胞転写法や密度勾配法を利用してスライドガラスに均一に塗抹する手法であり、標本作製手技が標準化されている<sup>3)</sup>。また、LBC で作製した標本は、標本作製時の細胞の乾燥、塗りむらによる細胞の重なりあいなどの染色の妨げになるアーチファクトがほとんどないことから ICC を利用しやすく、他臓器の細胞診でも利用されるようになってきた<sup>4-7)</sup>。一方で、IHC の染色条件

が十分吟味されずに ICC に適用される傾向があることや、ICC の手法が施設間により差があるため各施設で精度管理を行う必要があることなど、IHC の手技を ICC に用いる際の問題点や注意点が指摘されている<sup>8-10)</sup>。本研究では、ルーチンの検査の一つとして当院検査室に ICC を新たに導入するための最適な染色条件を決定するために、種々の条件下で ICC を行った。

### 方 法

#### 1. 材料

2015 年 7 月から 2015 年 10 月に採取された手術検体 (乳癌 1 例、胃癌 1 例、大腸癌 1 例、甲状腺癌 1 例) と血液検体 1 例を使用した。ルーチンの病理組織学的検索と免疫組織化学のために 10% 中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いた。5 mm 角未固定組織を 1 個採取し、LBC-SurePath 専用固定液のサイトリッチレッド (15-20% イソプロパノール/5-10% メタノール/0.4% ホルムアルデヒド/5-10% エチレンジグリコール) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) に入れて細切後、軽く攪拌し、一晚固定して細胞懸濁液とした。血液検体は 1500 rpm で 5 分間遠心し、パフィ

1) 福井総合病院検査課

2) 福井総合病院病理診断科

コート採取し、サイトリッチレッドに入れ混和、一晚固定した。作製した細胞懸濁液を専用スピッツに入れ、2500 rpm 5 分間遠心し、沈殿に精製水を加えて、塗抹した際に十分量の細胞が確認できる濃度に調整した。それを LBC-SurePath 専用スライドガラスのプレコートスライド (Becton Dickinson) に塗抹、10 分間静置の後に洗浄、95%エタノール液に浸漬した。

## 2. 免疫組織化学

今回、免疫細胞化学の条件を検討するのに適切な検体をスクリーニングするために、ホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、検討する抗体を用いて免疫染色した。免疫染色のために Envision システムを用いた。検討した抗体は、当院にて使用頻度の高い抗体である抗汎サイトケラチン抗体 (クローン AE1/AE3)、抗白血球共通抗原抗体 (LCA)、抗癌胎児抗原抗体 (CEA)、抗サイトケラチン 7 抗体 (CK7)、抗サイトケラチン 20 抗体 (CK20)、抗 TP53 抗体 (p53)、抗甲状腺転写因子-1 抗体 (TTF-1) を用いた。二次抗体はセイヨウワサビペルオキシダーゼ (horse raddish peroxidase, HRP) 標識抗ウサギ/マウス IgG 抗体ポリマー試薬を用いた。また、抗原賦活液として Target Retrieval Solution (pH 9.0)、内因性ペルオキシダーゼ阻害剤として 0.03%過酸化水素/15 mmol/l アジ化ナトリウム混合液を、発色試薬として 1-5%ジアミノベンジジンを用いた。

製造会社 (ダコ、東京、日本) の推奨する手順に基づいて染色した。アルコールに浸漬したスライドガラスを水洗し、内因性ペルオキシダーゼ阻害剤で 10 分間反応させ、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2) で 3 回洗浄後、一次抗体で 30 分間、二次抗体で 30 分間と順に反応させた。PBS で 3 回洗浄後、発色試薬を 30 秒~1 分間反応させ、0.5%ヘマトキシリンで 1~2 秒間核を染色した。以上の反応はすべて室温で行った。

## 3. 免疫細胞化学

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片にて陽性であることを確認した症例 (TTF-1, 甲状腺癌 1 例; p53, 大腸癌 1 例; LCA, 血液検体 5 例; CK7, 乳癌 1 例; CK20, 大腸癌 1 例; CEA, 大腸癌 1 例) のサイトリッチレッド固定細胞診標本を用いて免疫染色を行った。Envision システムを用いた免疫染色は基本的に組織切片と同様に行った。

検討項目は (1) 非特異的なタンパク吸着阻害の有無、(2) 一次抗体希釈倍率 (抗体希釈倍率)、(3) 一次抗体と二次抗体の反応時間 (抗体反応時間) による染色性の良否とした。設定した条件は、(1) 非特異的反応阻害は有、無の 2 通り、(2) 一次抗体希釈倍率は 1 倍、5 倍、20 倍の 3 通り、(3) 抗体反応時間は 5 分、15 分、30 分の 3 通りである。非特異的タンパク吸着阻害剤として、0.25%カゼイン加ウシ血清アルブミンを用い、内因性ペルオキシダーゼ阻害反応の前に 10 分間反応させた。

なお、反応強度が弱かった場合は抗原賦活液 (Target Retrieval Solution, pH 9.0) で 98°C 10 分間の熱処理をして同様に行った。陰性対照標本では一次抗体を PBS に変えて反応させた。なお、免疫組織化学及び免疫細胞化学で用いたキットあるいは個々の試薬はダコ・ジャパン (東京、日本) から購入した。

## 4. 染色強度の評価

染色の良否は 3 段階に分類した。「good」は強い特異染色が 50% 以上の細胞に見られ、「bad」は強い特異染色が 20% 以下の細胞に見られる場合にそのように判定した。それらの中間は「insufficient」とした。判定は 1 人の細胞検査士と 1 人の病理医によって行われた。

## 5. 倫理的配慮

本研究はあらかじめ書面にて同意を得た患者検体を使用し新田塚医療センター倫理審査委員会の了承を受けて実施した (新倫 27-29 号)。

## 結 果

全ての条件において、非特異的タンパク吸着の阻害を行った場合と行わなかった場合との間に全条件で違いはみられなかった。p53 と TTF-1 では、抗原賦活をしなかった場合、良好な染色性が得られなかった (表 1)、抗原賦活を行い再検討した (表 2)。二人の評価はほぼ同じで、「bad」と「insufficient」の違いあるいは

「insufficient」と「good」の違いが 81 条件中 8 条件 (9.9%) にあったのみで、「bad」と「good」の評価が分かれるような大きな相違はなかった。しかし、今回は少しでも評価が分かれる条件は解析から除外して、「good」を示す条件のみを解析した。抗体希釈倍率が薄い (20 倍) の場合、LCA と CK7 以外は良好な染色性は得られなかった。また、抗体反応時間が短い (5 分) 場合、LCA と CK7 以外は良好な染色性は得られなかった。抗体反応時間が充分長い (30 分) 場合は、抗体希釈倍率は全ての抗

体で良好な染色性が得られた。LCA と CK7 では、希釈倍率が 1 倍または 5 倍ならば、5 分という短い抗体反応時間でも良好な染色だった。LCA と CK7 ではまた抗体反応時間が 15 分以上なら、薄い抗体希釈倍率 (20 倍) でも良好な染色性が得られた。

## 考 察

細胞診の精度を上げるために ICC を導入する利点は大きいですが、その手順は施設間で差があり、適切な染色条件は各施設で定める必要がある。そこで IHC の試薬を ICC に利用して 7 種類の抗体について染色最適条件を検討したが、最適抗体希釈倍率は多くが 1 倍であった。適切な染色性が得られる最短の最適抗体反応時間は抗体によって差があったが、どの抗体でも最長 30 分の抗体反応時間で良好に染色され、また、過染することはなかった。抗体反応時間が長くて洗浄が不十分であると非特異的タンパク吸着反応により過染することはしばしば経験されることであるが、今回は一次抗体製品が IHC 用に調整された希釈済み抗体であったため、ルーチンの免疫組織化学と同様に、非特異的タンパク吸着阻害反応が不要という結果になったと考えられる。

IHC 用に調整された抗体が ICC に利用できるかは不明であったが、検討の結果により IHC で用いている試薬をそのまま ICC に使用できることが示された。この点については、College of American Pathologists (CAP) が実施した ICC のサーベイにおいて、回答した 184 施設中 181 施設で IHC と同希釈倍率の抗体を ICC で実施していたという報告があり<sup>9)</sup>、IHC と同様の希釈倍率の抗体を ICC に用いることは一般的に受け入れられているようである。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片と未固定あるいはアルコール固定凍結切片での抗原抗体反応の感度は大きく異なり、未固定凍結切片では直接法や間接法が用いられるのに対してホルマリン固定パラフィン包埋切片には 1000 倍以上の感度を持つ、PAP 法、ABC 法、デキストランポリマー法 (Envision を含む) 等が開発され、病理診断に用いられてきた。従って、今回ホルマリン固定パラフィン包埋切片で用いられている 1 倍希釈の濃度よりずっと薄い濃度を用いた方がよいと期待されたが、結果は多くの抗体で同じ 1 倍希釈が最も良好な染色性を得られる条件だった。また、アルコール固定の細胞診標本はホルマリン固定の組織標本と違って、架橋による

タンパクのマスキングがなく抗原賦活化は必要でないといわれている<sup>11)</sup>。しかし、本検討では p53, TTF-1 の 2 種の抗体で前熱処理が必要であった。これらの結果は、今回用いた固定液のサイトレッドに 0.4%ホルムアルデヒド(1.1%ホルマリン)が含まれているためと考えられる<sup>12)</sup>。また、ホルマリンを含まないエタノール固定標本でも核内抗原を認識する抗体において前処理が必要不可欠であったという報告<sup>13)</sup>は、今回の研究において抗原賦活が必要であった p53 と TTF-1 が核内抗原であることと一致する。このことは組織切片では核内抗原が露出しているのに対し、細胞診標本では核内抗原に抗体が到達するためには細胞膜と核膜の二重のバリアーを通り抜ける必要があることが関係していると考えられる。

今回、細胞診検体では非特異的反応の影響があると仮定し、非特異的タンパク吸着阻害の効果を検討したが、非特異的反応はほとんど見られなかった。非特異的反応は疎水結合やイオン結合により抗体が目的とする抗原意外と反応することで生じ、同じ動物種の免疫グロブリンやガゼイン、ウシ血清アルブミンなどのキャリアタンパクと反応させることで減弱されると言われている<sup>14)</sup>。今回用いた非特異的タンパク吸着阻害剤は非特異的反応を抑制するキャリアタンパクを含んでいた。非特異的タンパク吸着阻害剤による差が認められなかった原因は不明であるが、余計なステップを省くことができることが明らかになったことはルーチンの染色法に寄与するものである。

ICC を実施するにあたり LBC-SurePath 法を利用した。LBC-SurePath 法は数種類ある LBC の手法の一つで、検体を専用の固定液で処理後に、細胞附着を促す荷電コーティングを施した専用スライドガラスに薄く均一に塗抹する方法である。調整した細胞混濁液をガラスに滴下して放置すると、マイナスに荷電した細胞が自然重力により沈み、プラスに荷電したガラスに引き付けられて付着することで均一な塗抹標本ができると言われている<sup>3)</sup>。LBC-SurePath 法を含めた LBC は、標本作製手技の標準化や、検体不適性率の低下、癌の検出率やスクリーニング効率性の向上に寄与してきたが<sup>15,16)</sup>、最近では ICC への応用が期待できることも報告されている<sup>4,7)</sup>。ICC において LBC を用いる利点としては、余分な血液や細胞外成分の除去により非特異的反応の影響を少なくできる、細胞の重積が少なく染色評価しやすいことが挙げられている<sup>8)</sup>。一方、従来の直接塗抹法では、細

胞の機械的な変性や破壊によって非特異的反応が生じやすく、場合によっては細胞膜や細胞質抗原には適さないと指摘されている<sup>17)</sup>。両者に利点と欠点があるが、本検討ではいずれも細胞形態が保たれ、良好な染色が得られることが明らかになった。

LBC を ICC に用いるもう一つ利点として抗原保存性があげられる。本研究では LBC の専用固定液としてサイトリッチレッドを用いたが、サイトリッチレッドの抗原保存性に関する研究では、直接塗抹標本と比較し、サイトリッチレッドで処理された標本の長期保存性が示されている<sup>18)</sup>。また、DNA の保存性に関しても、95% エタノール、4%中性緩衝ホルマリンに比べて、サイトリッチレッドは良好な結果が得られたとされている<sup>19)</sup>。今後、悪性腫瘍の診断や治療に遺伝子学的検索を利用する機会が増えることが予想され、長い塩基配列を検索することが必要な特殊な場合を除き ICC と遺伝子検査の双方をカバーできる利点は大きいと言える。以上のことを考慮すると、ICC を導入する際には、標本作製の再現性が良く、長期保存性が期待できる LBC を利用する方がよいと考えられた。

抗体の希釈倍率に関しては、20 倍でも良好な染色性が得られる抗体もあり、経済性を考えると抗体により希釈倍率を変えることもできるが、条件を抗体によって頻繁に変えると言う煩雑さから希釈ミスが起こる可能性も考えられ、全て 1 倍というのが現実的な方法と考えられた。

## 結 論

検討した 7 種の抗体 AE1/AE3, LCA, CEA, CK7, CK20, p53, TTF1 について、LBC を利用した ICC はルーチンの検査に利用でき、染色条件は基本的に IHC と同じ抗体希釈倍率で使用するのがよいこと、非特異的反応ブロッキング処理は ICC において不要であることが明らかになった。

## 文 献

- 1) Edward B, Faris M, Steven M, et al. A limited immunocytochemical panel for the distinction of subepithelial gastrointestinal mesenchymal neoplasm sampled by endoscopic ultrasound-guided f- fine-needle aspiration. *Am. J. Clin. Pathol* 2008; 129: 219-225.
- 2) Harton AM, Wang HH, MD, Schnitt SJ, et al. p63 immunocytochemistry improves accuracy of diagnosis with fine-needle aspiration of the breast. *Am. J. Clin. Pathol* 2007; 128: 80-85.
- 3) 久布白 兼行, 田岡 英樹, 山本 康弘. 液状化検体細胞診. *産婦人科治療* 2011; 102 (6): 930-936.
- 4) Sahebalil S, Depuydt CE, Boulet GAV, et al. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int. J. Cancer* 2006; 118: 1254-1260.
- 5) Zhang Z, Yuan P, Guo H, et al. Assessment of hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in breast carcinoma using Thin-Prep cytology fine needle aspiration cytology FISH experience from China. *Medicine* 2015; 94: 24.
- 6) Sahebalil S, Depuydt CE, Segers K, et al. Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool?. *J. Clin. Pathol* 2003; 56: 681-686.
- 7) Rossi ED, Raffaelli M, Minimo C, et al. Immunocytochemical evaluation of thyroid neoplasms on Thin-Layer smears from fine-needle aspiration biopsies. *Cancer (Cancer cytopathology)* 2005; 105 (2): 87-95.
- 8) Larry J, Whitney A. Application of immunocytochemistry to cytology. *Arch. Pathol. Lab. Med* 2008; 132: 373-383.
- 9) Kirbis IS, Maxwell P, Flezar MS, et al. External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathol* 2011; 22: 230-237.
- 10) Fischer AH, Schwartz MR, Moriarty AT, et al. Immunohistochemistry practices of cytopathology laboratories. *Arch. Pathol. Lab. Med*; 138: 1167-1172.
- 11) Shi AR, Shi Y, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J. Histochem. Cytochem.* 2011; 59(1): 13-32.
- 12) Bjonness-Jacobsen EC, Eriksen AKK, Hagen VN, et al. The effect of the small amount of formaldehyde in the SurePath liquid when establishing protocols

for immunocytochemistry. *Cytojournal* 2016; 13: 27.

13) Denda T, Kamoshida S, Kawamura J, et al. Optimal antigen retrieval for ethanol-fixed cytologic smears. *Cancer (Cancer Cytopathol.)* 2012; 120: 167-176.

14) Howard GC, Kaser MR. Making and using antibodies: A practical handbook. 2nd ed. New York: CRC press; 2013: 312-315.

15) Karnon J, Peters J, Platt J, et al. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technology Assessment* 2004; 8: 20.

16) Fadda G, Rossi ED. Liquid-based cytology in fine-needle aspiration biopsies of the thyroid gland. *Acta Cytol.* 2011; 55: 389-400.

17) Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathol.* 2011; 22: 215-229.

18) Sauer T, Ebeltoft K, Pedersen MK, et al. Liquid based material from fine needle aspirates from breast carcinomas offers the possibility of longtime storage without significant loss of immunoreactivity of estrogen and progesterone receptors. *Cytojournal.* 2010; 7: 24.

19) Kawahara A, Taira T, Abe H, et al. Fixation effect of SurePath preservative fluids using epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for immunocytochemistry. *Cancer (Cancer Cytopathol.)* 2014; 122: 145-152

表 1. 抗体希釈倍率と抗体反応時間の違いによる染色性の良否（抗原賦活なし）

抗体反応 時間	抗体希釈 倍率	抗原名または抗体クローン名						
		p53	TTF-1	LCA	CEA	AE1/AE3	CK7	CK20
5 分	X1	bad	bad	good	bad	Insufficient	good	insufficient
	X5	bad	bad	good	bad	bad	good	bad
	X20	bad	bad	I/B	bad	bad	insufficient	bad
15 分	X1	bad	bad	good	good	good	good	good
	X5	bad	bad	good	insufficient	insufficient	good	insufficient
	X20	bad	bad	good	bad	I/B	good	bad
30 分	X1	bad	I/B	good	good	good	good	good
	X5	bad	insufficient	good	good	G/I	good	good
	X20	bad	insufficient	good	bad	insufficient	good	insufficient

good, intence staining in more than 50% of tumor cells; bad, intence staining less than 20%; I/B, insufficient or bad; G/I, good or insufficient.

表 2. 抗体希釈倍率と抗体反応時間の違いによる染色性の良否（抗原賦活あり）

抗体反応 時間	抗体希釈 倍率	抗原名	
		p53	TTF-1
5 分	X1	bad	I/B
	X5	bad	bad
	X20	bad	bad
15 分	X1	G/I	good
	X5	insufficient	good
	X20	bad	G/I
30 分	X1	good	good
	X5	good	good
	X20	bad	G/I

good, intence staining in more than 50% of tumor cells; bad, intence staining less than 20%; I/B, insufficient or bad; G/I, good or insufficient.

○○○○○○○○○○○○○○