


第33回日本臨床細胞学会北海道支部学術集会
2012年 11月 18日 (日)

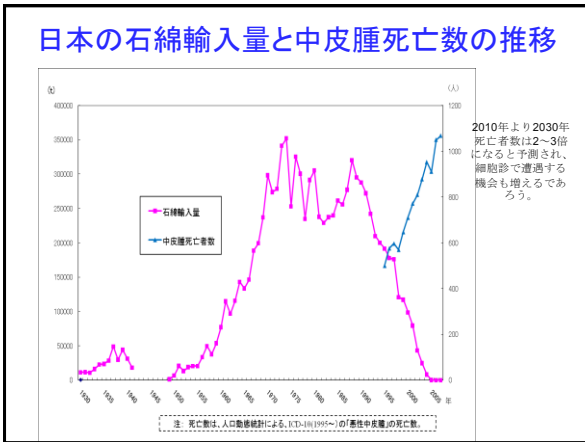
日本での中皮腫発生状況と中皮腫細胞診断の問題点

山口県立総合医療センター病理診断科・中央検査部
亀井 敏昭



日本におけるアスベスト問題の現状

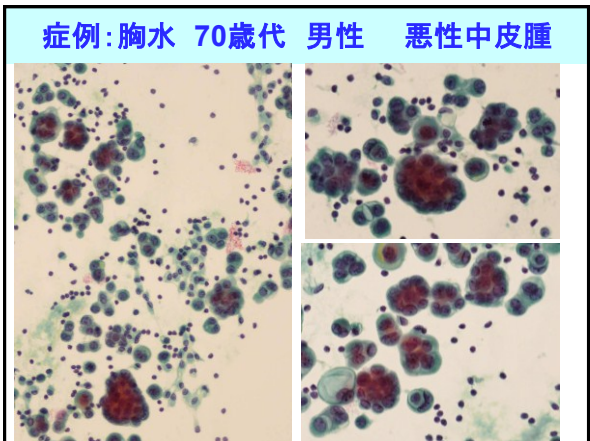
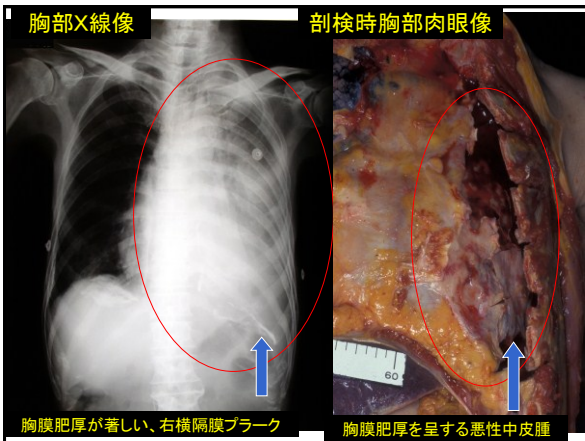
- 石綿関連疾患は労災補償の対象
- **2005年:クボタショックに端を発して環境曝露がクローズアップ**
- 2006年:石綿救済法による患者認定(中皮腫、肺癌)
- 2010年:指定疾患の追加(びまん性胸膜肥厚、石綿肺)
- **石綿救済法による中皮腫・肺癌の認定には病理学的な資料が必須**
- 中皮腫では組織検査が困難なことがあり、細胞診断のみの症例が少なくない
- **診断が確定であれば、細胞診断のみでも認定可能なことがある**
- **細胞診断のみの申請が漸増傾向**
- 中皮腫は増加しつつあるが1施設で経験できる症例は多くない(細胞診断の経験が少ない)
- 細胞診断の確度は一定していない(体液液の細胞診断は難しい)
 - ⇒多数症例に基づく細胞診断の基準が必要
 - ⇒分かりやすく再現性のよい基準が望まれる
 - ⇒救済を推進する観点からも細胞診断の積極的活用が望まれている
- 日本肺癌学会 肺癌取り扱い規約委員会
細胞診断基準改定委員会(秋田弘俊委員長)
中皮腫細胞診断評価ワーキンググループ(亀井敏昭グループ長)
検体:胸水、対象:上皮型悪性中皮腫、鑑別疾患:主として肺腺癌
成果の一部:肺癌取り扱い規約第7版(2010年)に細胞所見と付図が記載

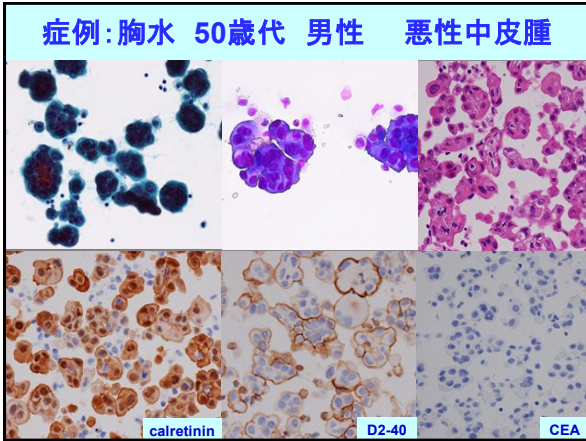


胸膜悪性中皮腫例 80歳代

主訴: 胸水貯留

職歴:
55歳まで農業機械などの製造工場に勤務、
61歳まで木工工場に勤務。明らかなアスベスト曝露歴はなかったが、剖検時の肺組織から多数のアスベスト小体が見つかった。



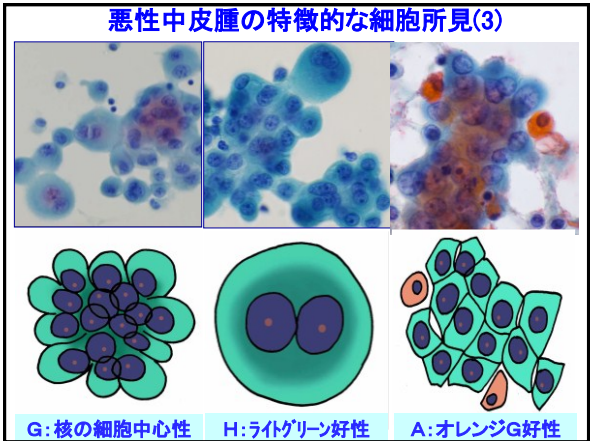
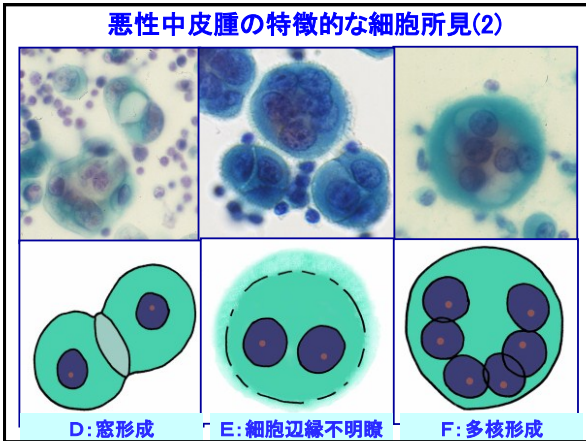
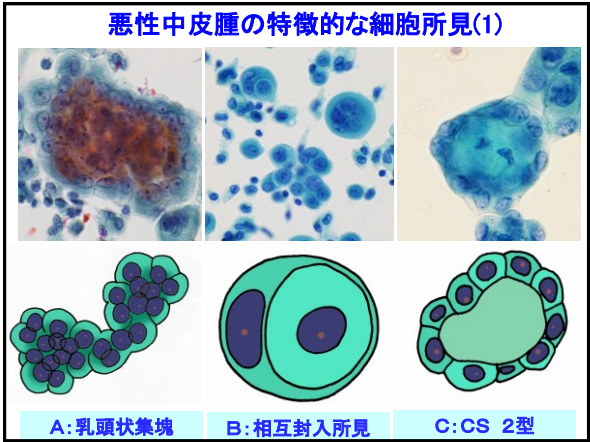


- 中皮腫に特徴的とされている所見**
- 球状・乳頭状集塊
 - 相互封入像
 - 窓形成 (window formation)
 - 細胞相接所見 (cell to cell apposition)
 - hump様細胞質突起
 - Collagenous stroma を有する細胞集塊
 - オレンジG好性細胞の出現
 - 多核細胞出現

日本肺癌学会
中皮腫細胞診評価ワーキンググループ
 (順不同)

責任者: 亀井敏昭
委員: 廣島健三、岡 輝明、河原邦光、河合俊明、
 大林千穂、武島幸男、秋田弘俊、児玉哲郎、嶋 榮
 辻村 亨、鍋島一樹、平野隆、前田昭太郎

サブグループ委員
責任者: 嶋 榮
委員: 丸川活司、三浦弘守、濱川真治、藤田 勝、片山博徳
 佐藤正和、青木 潤、渋谷秀美、三村明弘、松本慎二
 羽原利幸、山本格士





病理学的検査結果について

- 病理組織学的検査実施の場合
 - HE染色による形態的特徴と、免疫染色結果を詳細に記述
 - 免疫染色は、陽性抗体、陰性抗体、各々2抗体以上の確認が望ましい
- 細胞診のみの場合
 - パパニコロウ染色による形態的特徴と、免疫染色結果を詳細に記述
 - 免疫染色は、陽性抗体としてCalretinin、陰性抗体としてCEAを強く推奨

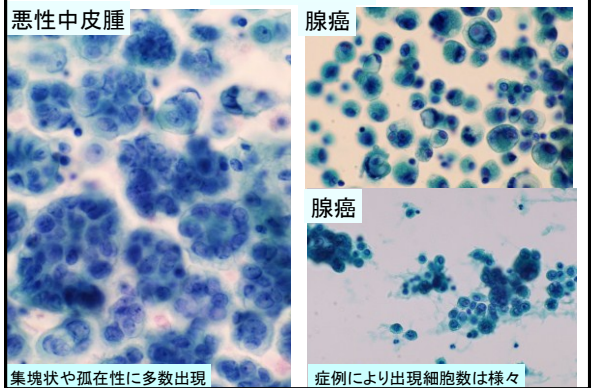
悪性中皮腫の細胞形態の特徴 (反応性中皮、腺癌との鑑別)

対象

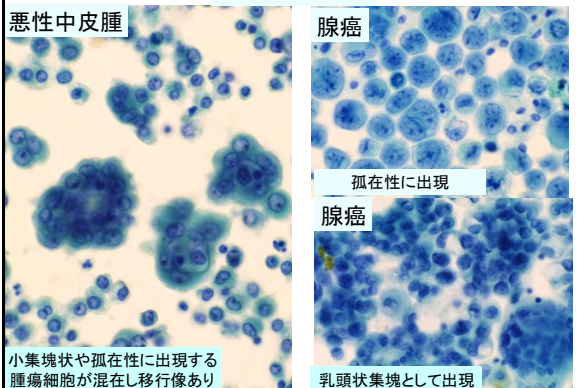
- ・悪性中皮腫 自験例、コンサルテーション症例 212例
- ・腺癌症例 自験例 62例
- ・反応性中皮症例 自験例 53例

・出現様式 ・細胞集塊 ・結合性 ・細胞質所見
・核所見 ・その他 について検討する。

出現様式



細胞集塊

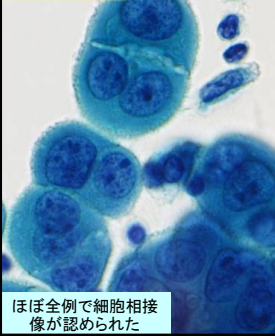


細胞集塊の特徴

- ・悪性中皮腫は球状、乳頭状集塊で出現し、背景の孤在性出現を示す腫瘍細胞との移行像が認められる。
- ・悪性中皮腫は球状細胞集塊と乳頭状細胞集塊が混在することが多く、平面的集塊で出現する場合は小集塊状出現および孤在性出現との混在が多い。
- ・反応性中皮細胞は比較的平面的な集塊で出現することが多い。
- ・腺癌細胞は乳頭状集塊で出現し、孤在性腫瘍細胞出現と混在することが多い。

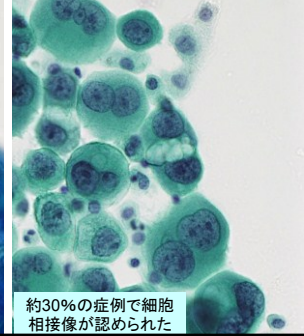
細胞の結合性

悪性中皮腫



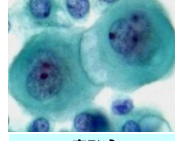
ほぼ全例で細胞相接像が認められた

腺癌

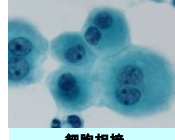


約30%の症例で細胞相接像が認められた

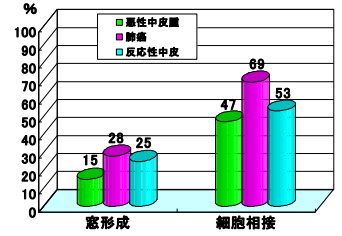
細胞相互の関係 (窓形成、細胞相接)



窓形成



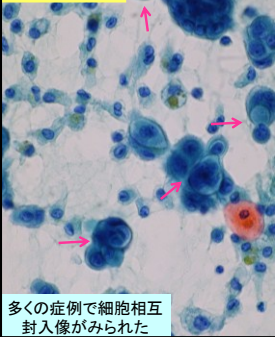
細胞相接



肺癌 NS 中皮腫<反応性中皮 p=0.97 p<0.01 肺癌 NS 中皮腫 NS 反応性中皮 p=0.56 p=0.39

細胞の相互封入所見

悪性中皮腫



多くの症例で細胞相互封入像がみられた

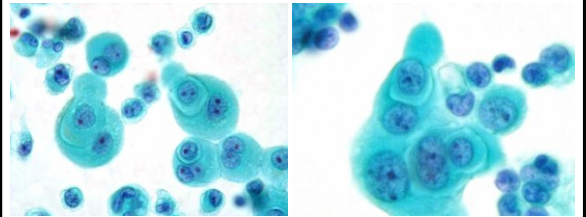
悪性中皮腫



Hump様細胞突起を有する鑄型細胞が多くみられる

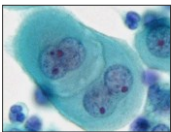
相互封入所見

(hump 様細胞質突起を有する鑄型細胞)

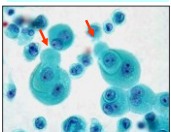


Hump様細胞質突起は、主として2個の細胞からなるいわゆる相互封入像で、ライトグリーン好染性のコブ状の突起を指す(矢印)。侵入細胞によって核は押しやられ、細胞質は侵入細胞を取り囲む。侵入細胞の取り残された細胞質がコブ状の細胞質突起として観察される。
日本臨床細胞学会誌 第42巻 第1号、2003年、p10-16

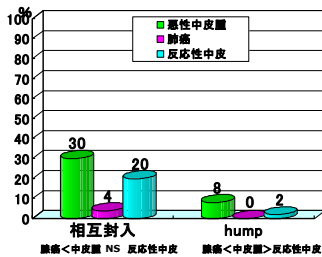
細胞相互の関係 (細胞相互封入、Hump様突起)



相互封入像



Hump様突起



肺癌<中皮腫 NS 反応性中皮 p<0.01 p=0.97 肺癌<中皮腫>反応性中皮 p<0.01 p<0.01

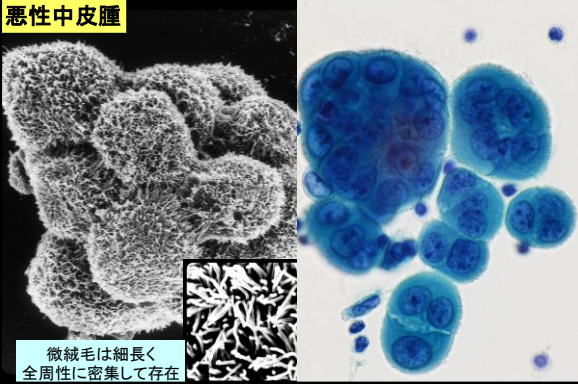
Hump様細胞突起の出現率
 肺癌: 3.2%, 反応性中皮: 50.0%
 進行中皮腫: 85.5%, 早期中皮腫: 80.0%

孤在性細胞の結合性の特徴

- 悪性中皮腫例では全例で細胞相接像が認められ、多くの症例で細胞相互封入像が認められた。また、Hump様細胞突起を有する鑄型細胞が多く認められた。
- 反応性中皮例では全例で細胞相接像がみられ、少数例で細胞相互封入像がみられた。
- 腺癌例では約30%で細胞相接像がみられ、細胞相互封入像はみられるが、Hump様細胞突起を有する鑄型細胞は少ない

細胞質辺縁の性状

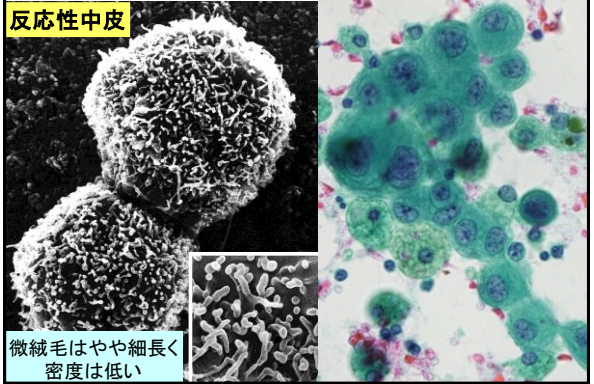
悪性中皮腫



微絨毛は細長く
全周性に密集して存在

細胞質辺縁の性状

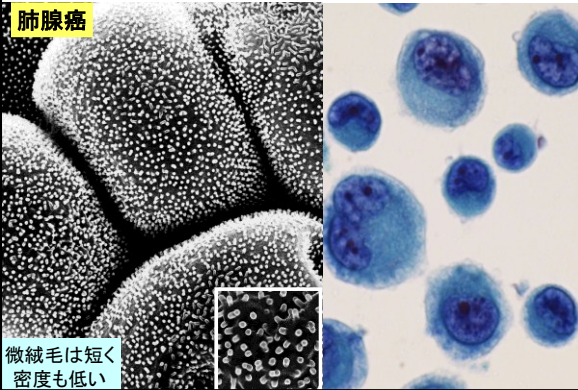
反応性中皮



微絨毛はやや細長く
密度は低い

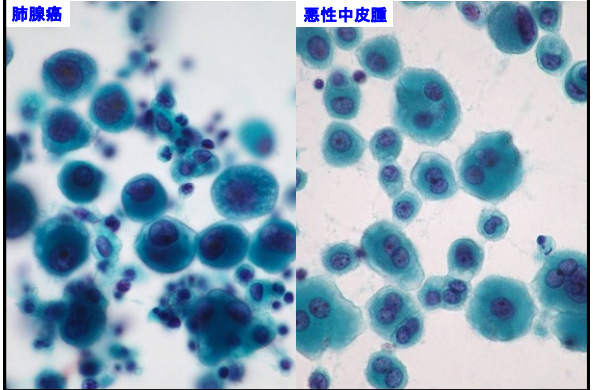
細胞質辺縁の性状

肺腺癌

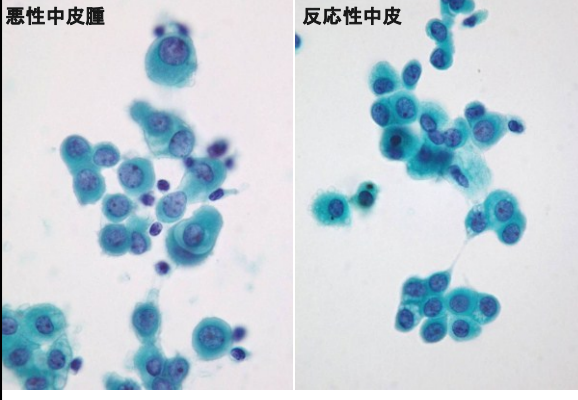


微絨毛は短く
密度も低い

悪性中皮腫 vs 肺腺癌



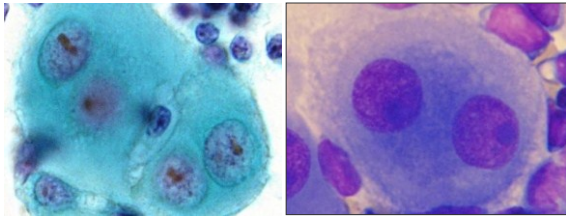
悪性中皮腫 vs 反応性中皮



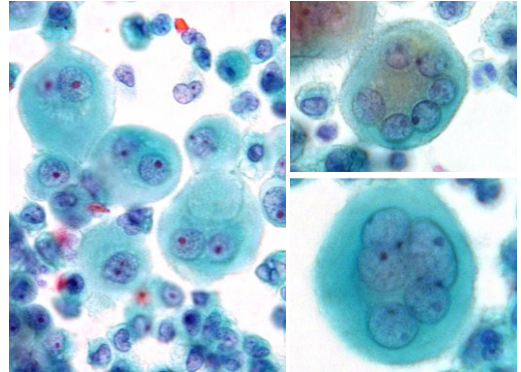
細胞質辺縁の特徴

- ・ 悪性中皮腫はほぼ全例で細胞質辺縁が不明瞭な細胞が多く出現していた。
- ・ 反応性中皮は一部辺縁が不明瞭な細胞成分を認めるが、中皮腫との比較では相対的に辺縁は明瞭化している。
- ・ 腺癌細胞は細胞質辺縁が明瞭な細胞が多く、半数以上の例で不明瞭な細胞の混在も認められた。

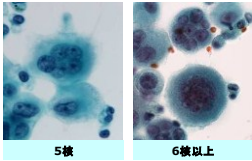
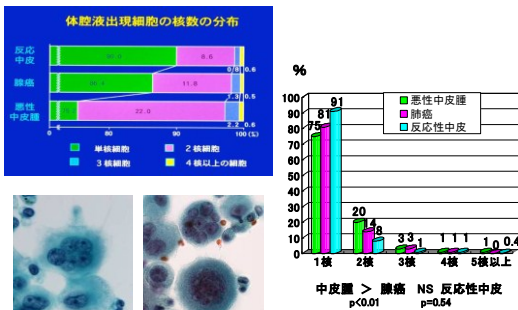
核所見 類円形核 明瞭な核小体



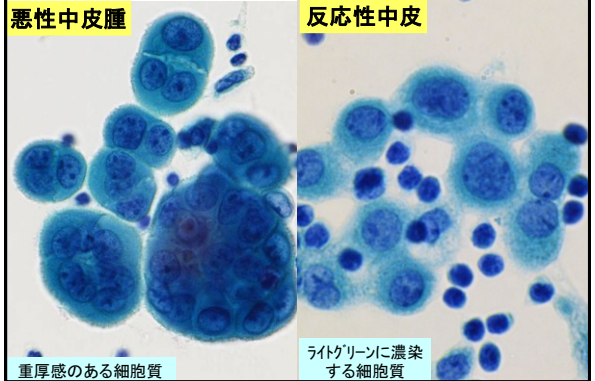
核所見2 (多核細胞) 軸対称性2核細胞



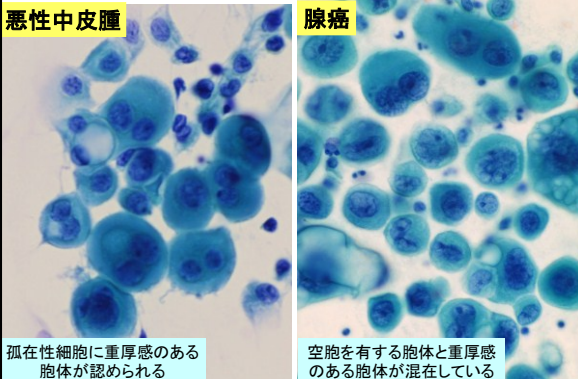
多核細胞出現率の比較



細胞質の性状

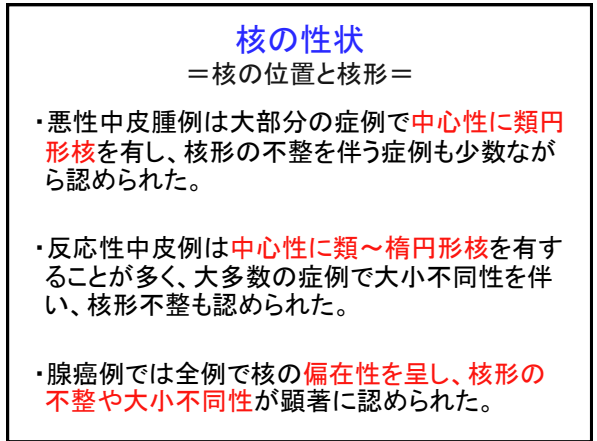
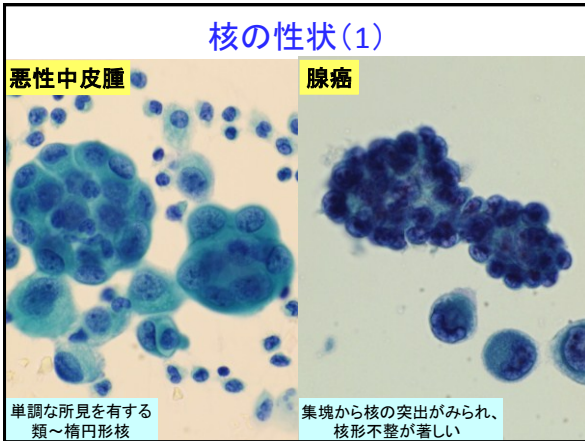
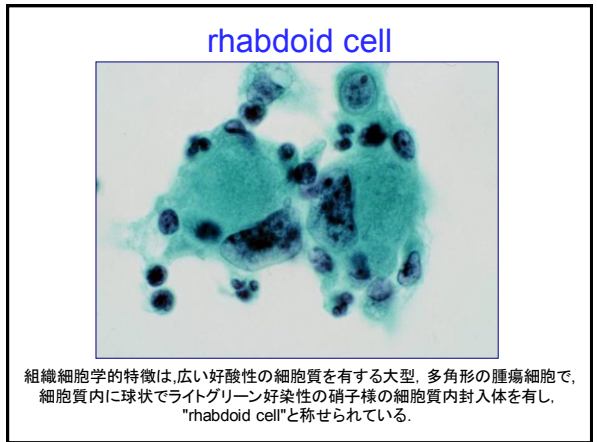
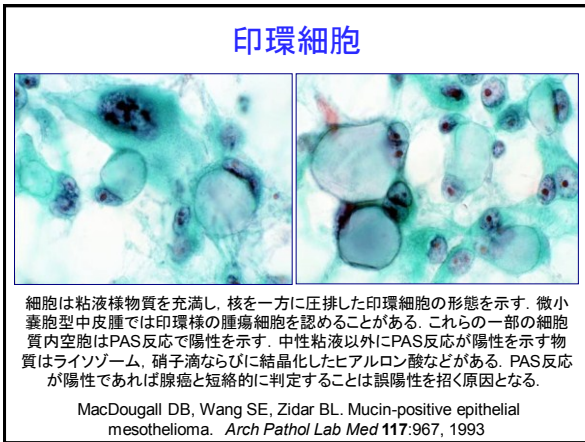
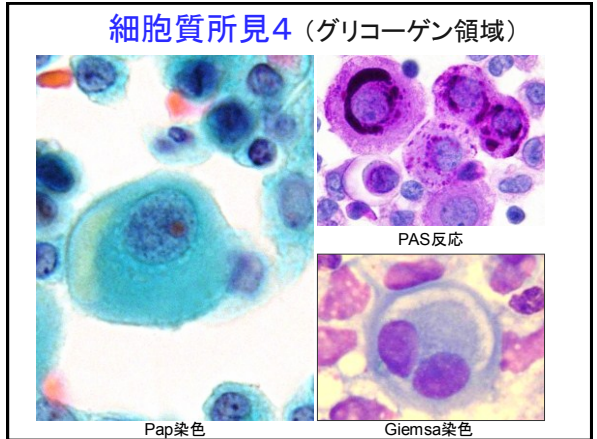
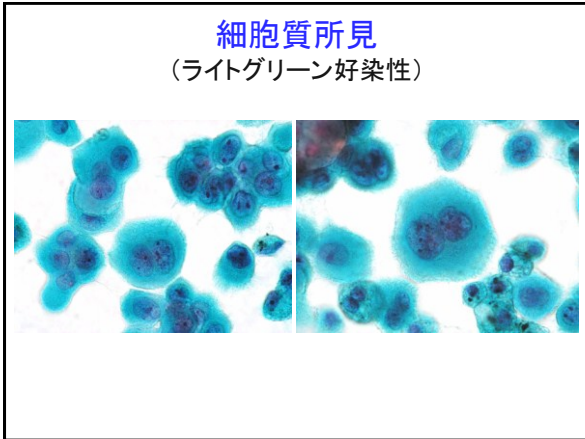


細胞質の性状

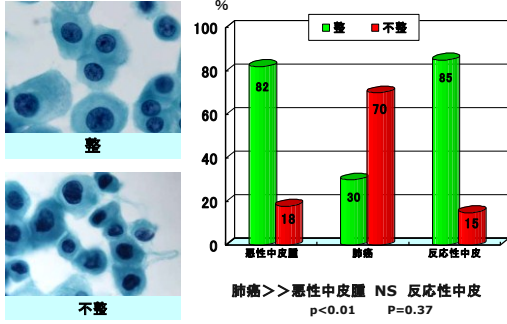


細胞質の性状

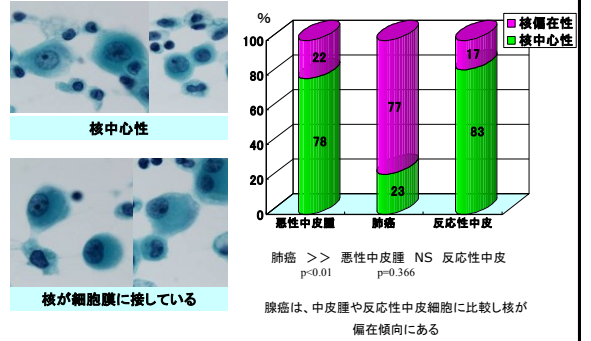
- 悪性中皮腫例では細胞質に**重厚感**があり、孤立性細胞では特に重厚感が目立っていた。
- 反応性中皮例はライトグリーンに濃染する細胞が多くみられたが、悪性中皮腫例のように特に重厚感の目立つ孤立性細胞の出現は目立たなかった。
- 腺癌細胞では全般に**淡い細胞質**を有する症例が目立つが、ときに重厚感を示す細胞が認められる例もあり、中皮腫との鑑別が難しい症例が認められることがある。



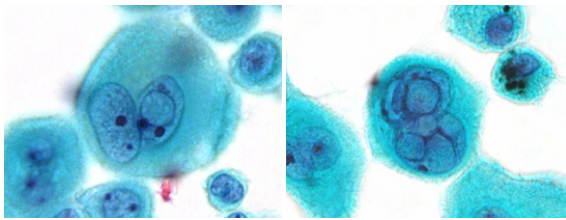
核形不整の比較



中皮腫, 腺癌, 反応性中皮の核位置の比較



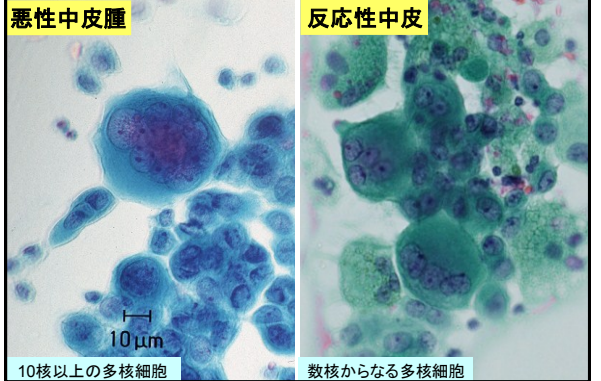
核所見 (核内封入体)



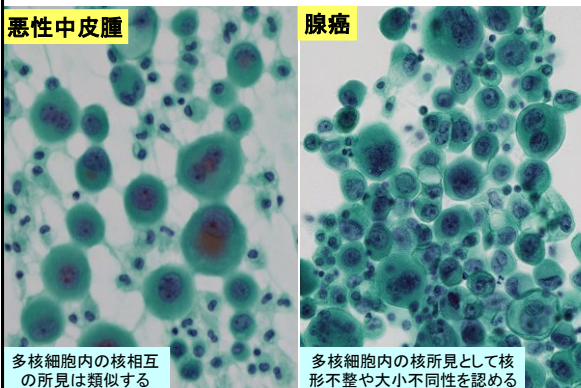
核内細胞質封入体

進行中皮腫	20/172 = 11.6%	中皮腫	32/212 = 15.1%
早期中皮腫	12/40 = 30.0%	反応性中皮	6/50 = 12.0%
肺腺癌	6/16 = 37.5%		

核の性状(2)



核の性状(2)



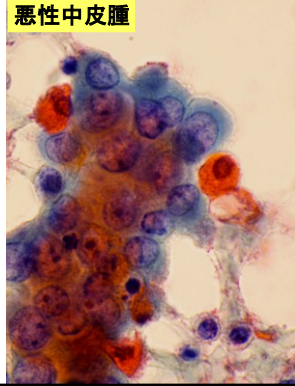
核の性状(2)

= 多核細胞の核の性状 =

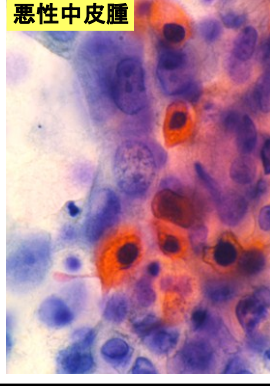
- 悪性中皮腫症例では多核細胞の出現が目立ち、**多核細胞内の核所見は類似**していた。
- 反応性中皮例では多核細胞の出現が目立ち、多核細胞内の核所見は類似していた。
- 腺癌例では多くの症例で多核形成が認められ、多核細胞内の核所見として**核形不整や大小不同性**が認められた。

オレンジG好性細胞 (Orangeophilic cell)

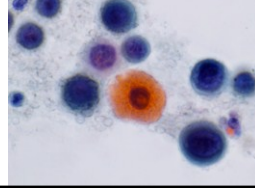
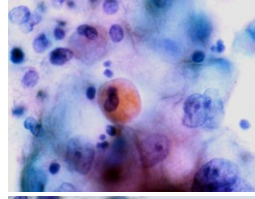
悪性中皮腫



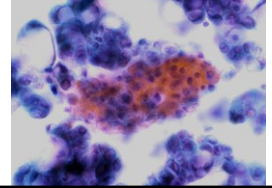
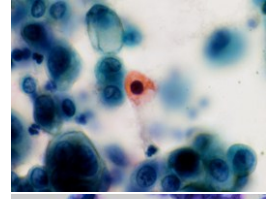
悪性中皮腫



肺腺癌



卵巣腺癌



orangeophilic cell 出現頻度

疾患	—	1+	2+	3+	
悪性中皮腫 (24例)	6 (25.0%)	6 (25.0%)	5 (20.8%)	7 (29.2%)	48.6%
反応性中皮 (53例)	51 (96.2%)	1 (1.9%)	1 (1.9%)	0	9%
肺腺癌 (25例)	23 (92.0%)	1 (4.0%)	0	1 (4.0%)	22.0%
卵巣腺癌 (13例)	10 (76.9%)	2 (15.4%)	0	1 (7.7%)	

オレンジG好性細胞の由来について

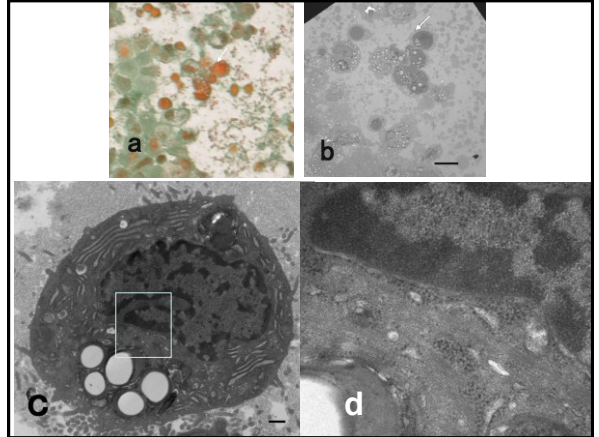
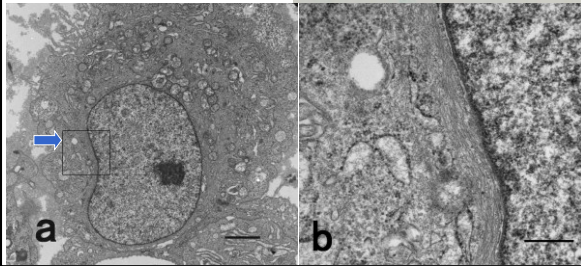
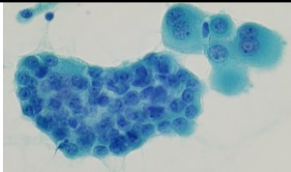
【目的】悪性中皮腫例の体腔液細胞診において、パパニコロウ染色標本中にorangeophilic cells (オレンジG好性細胞: OPC) が高頻度に出現することが報告されている。OPCの由来を電顕・光顕的に検索し明らかにした。

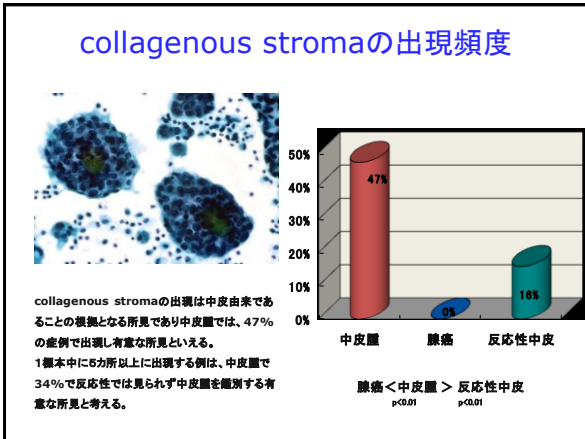
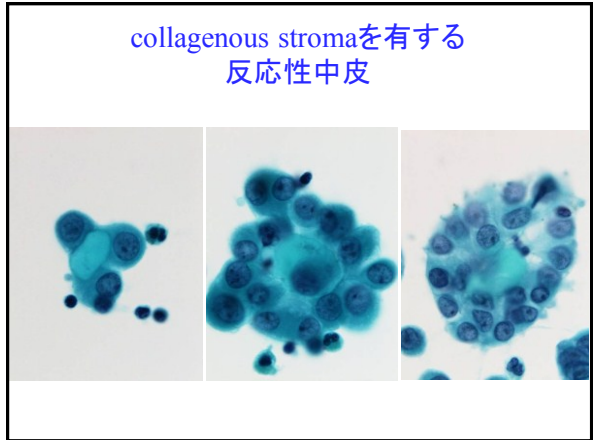
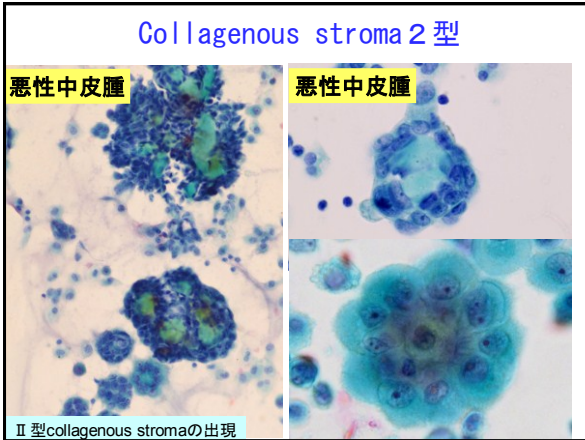
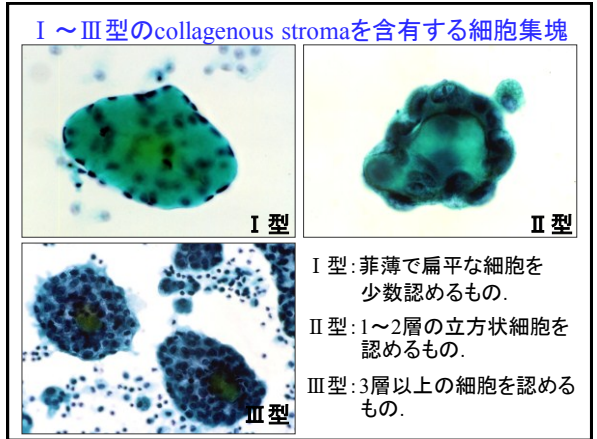
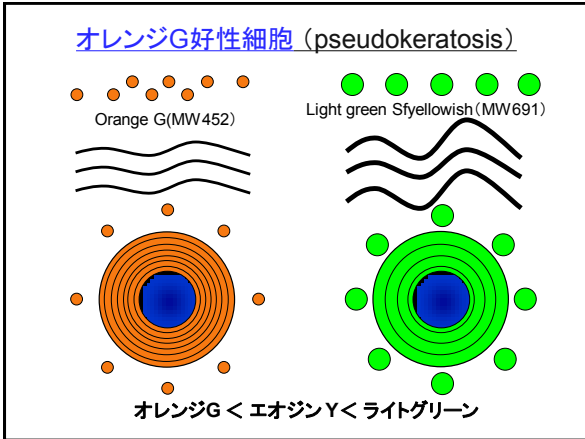
【材料】本総合医療センターのスメア標本にてOPCがみられた悪性中皮腫1例のエポキシ樹脂包埋ブロック (2.0%グルタルアルデヒド・1.0%四酸化オスミウム固定) を使用した。

【方法】1. エポキシ樹脂包埋ブロックから、連続して厚切り切片 (4.0 μm) と超薄切片 (80nm) を作製した。厚切り切片に対して、脱樹脂後パパニコロウ染色を施し、光顕的にOPCを観察した。隣接した超薄切片に対しては一般的な電子染色を施し、光顕の所見と対比させ、電顕的にOPCを観察した。

(共同研究者: 清水勇輝論文)

悪性中皮腫細胞の細胞所見と電顕所見





その他の特徴

- 悪性中皮腫例は多くの症例で**オレンジG好性細胞**の出現がみられ（自験例の約75%）、半数の症例（自験例の約56%）で**collagenous stroma 2型**を認めた。また、少数例であるが、**核内細胞質封入体**を有する腫瘍細胞が目立つ症例もあった。
- 反応性中皮例、腺癌例でオレンジG好性細胞は少数例で認められ、collagenous stroma 2型の出現は認められなかった（卵巣Clear cell carcinomaでは認められることが多い）。

悪性中皮腫の細胞形態の特徴

	悪性中皮腫	反応性中皮	腺癌
出現様式	細胞多数 (集塊状、孤在性)	細胞少数	症例により様々
細胞集塊	球状、乳頭状 孤在性細胞との移行像	平面的な出現	乳頭状集塊と孤在性細胞の混在
細胞質	辺縁は不明瞭 重厚感を有する (特に孤在性細胞)	辺縁はやや不明瞭 やや重厚感を示す	辺縁は明瞭 空胞状や淡明 一部でやや重厚感
結合性	細胞相接触あり hump様細胞突起多い	細胞相接触あり 細胞相互封入像は少数	細胞相互封入像あり hump様細胞突起少ない
核	中心性 類円形で均一感 多核細胞(均一感あり)	中心性 軽度の大小不同性 多核細胞	偏在性 核形不整・大小不同性 多核細胞(均一感なし)
その他	ホソG好性細胞 II型Collagenous stroma	両者ともに目立たない	両者ともに目立たない (顕微鏡細胞腺癌では II型Collagenous stromaを認める)

画像解析による検証

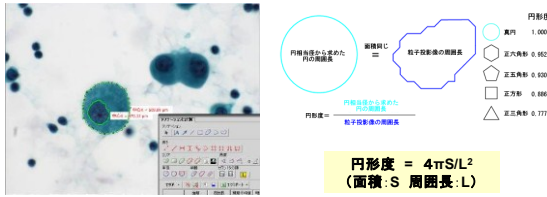
• 画像解析により検証可能であった5項目について検討した。

- 細胞の大きさ(細胞面積)
- 核の大きさ(核面積)
- 核、細胞質面積比
- 核形不整(核の円形度)
- 核偏在度

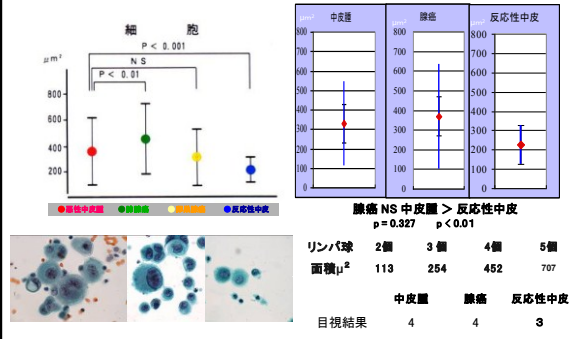
画像解析方法

目的細胞の細胞面積、核面積、周囲長、中心座標値の4項目を計測
細胞面積、核面積より核、細胞質面積比を算出
核面積および周囲長をより円形度を算出
細胞と核の中心座標値の差より核の偏在度を算出

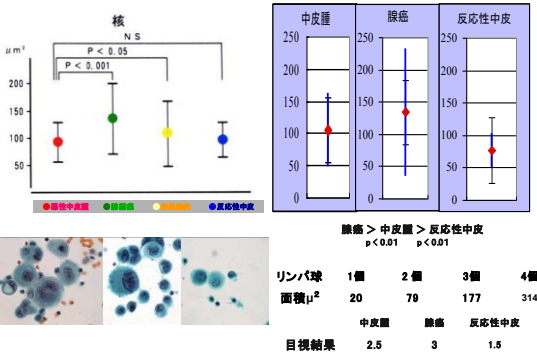
使用画像解析ソフト: Nikon NIS Elements D 3.1



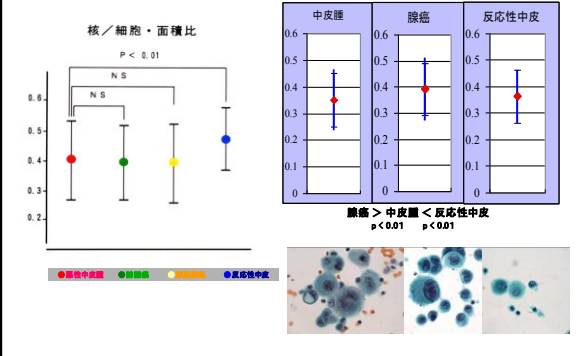
形態計測による細胞面積比較 平均±SD

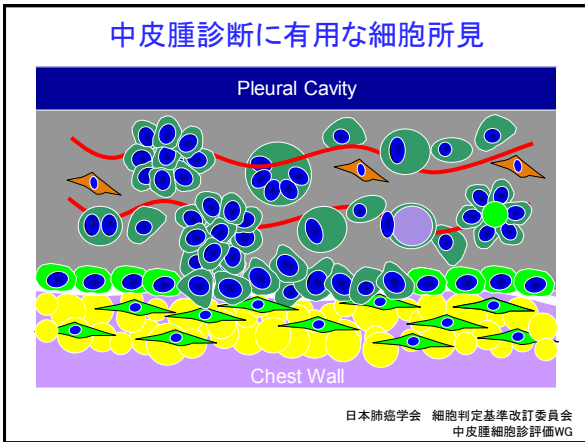
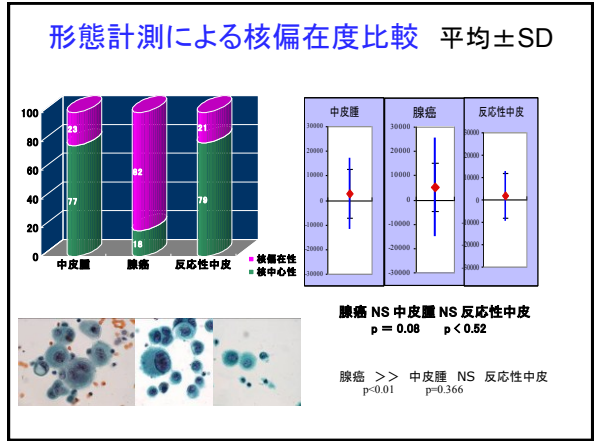
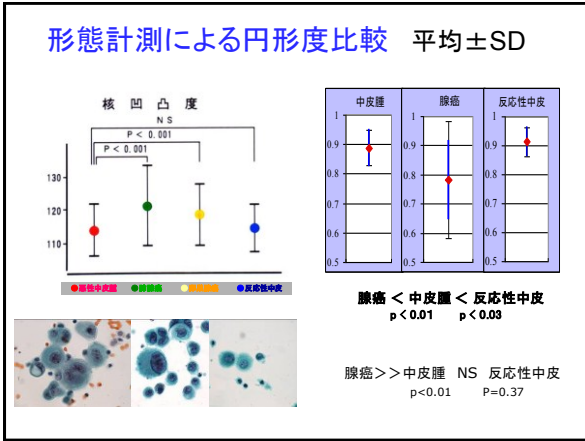


形態計測による核面積比較 平均±SD



形態計測によるN/C比比較 平均±SD





中皮腫判定に有用な所見 (P<0.01)

所見分類	特徴所見
①背景	ヒアルロン酸様物質
②集塊	Collagenous stroma
③細胞相互	hump
④細胞質	重厚感
⑤細胞質	オレンジG好性細胞 (P<0.05)
⑥細胞質	細胞辺縁不明瞭
⑦核所見(核数)	核数/細胞数
⑧核所見(多核化)	2核以上の出現率
⑨核所見(多核配列)	多核の花弁状配列 (P<0.05)

悪性中皮腫と肺腺癌の鑑別

悪性中皮腫 < 肺腺癌 (P<0.01)

相接所見
空胞化
印環細胞様変化
多房性変化
核形不整
4倍以上の核 (P<0.05)
粗顆粒状クロマチン
偏在する多核
核小体 腫大

悪性中皮腫 > 肺腺癌

組織球背景
好中球の出現
相互封入
細胞辺縁不明瞭
核円形性
核中心性
鏡面核配列

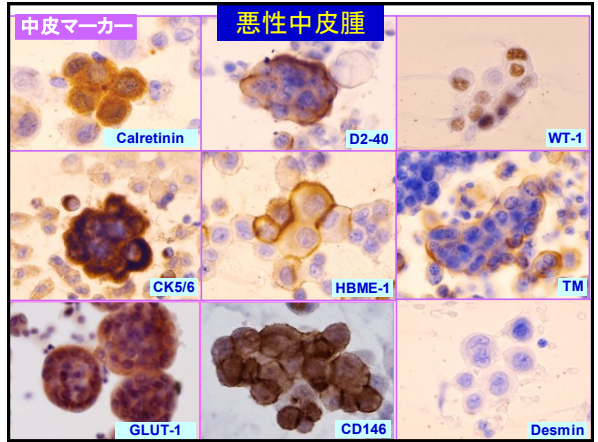
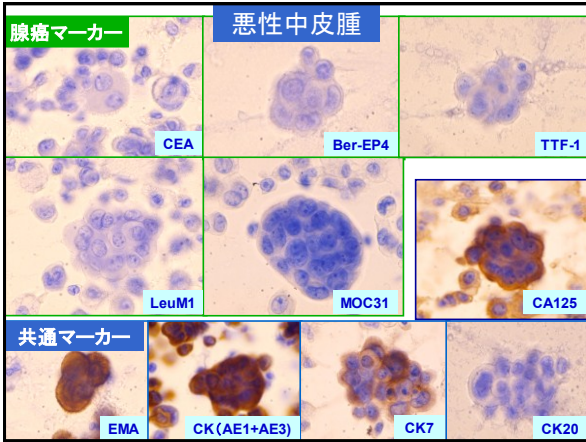
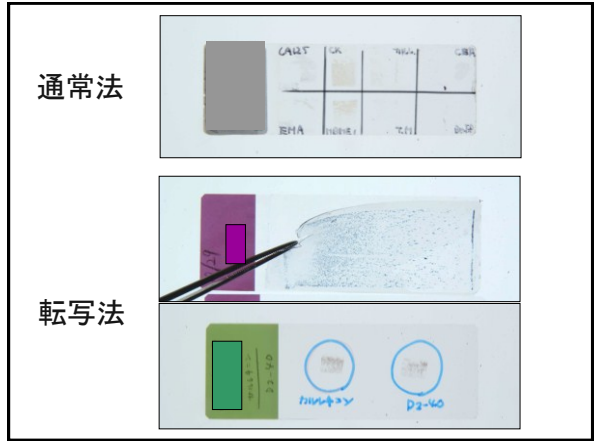
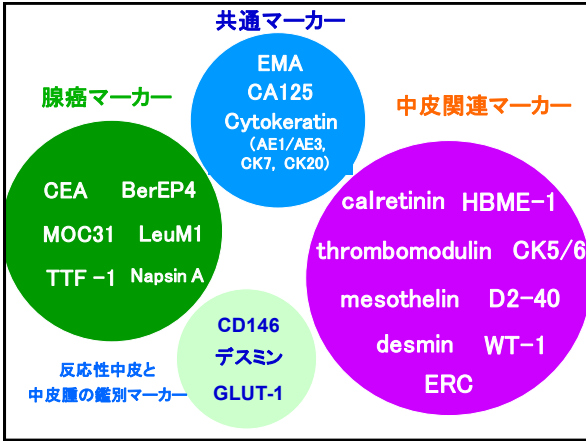
反応性中皮細胞と悪性中皮腫の鑑別

反応性中皮 > 悪性中皮腫 (P<0.01)

単個(孤立散在性)
2~4個の平面的集塊
3倍以下の細胞
窓形成
単核
不規則配列多核
核小体2~3個

反応性中皮 < 悪性中皮腫

5個以上の集塊
球状, 乳頭状, 花弁状
5個以上の平面的集塊
4倍以上の細胞の大きさ
空胞化
印環細胞様変化
多房性変化
4倍以上の核 (P<0.05)
核小体 1個



診断特性の比較

腺癌診断	感度(%)		特異度(%)	
	転写法	通常法	転写法	通常法
	CEA	60	75	100
BerEP4	70	78	100	91
MOC31	80	91	91	81
LeuM1	70	55	100	100

診断特性の比較

中皮腫診断	感度(%)		特異度(%)	
	転写法	通常法	転写法	通常法
	D2-40	93	92	100
calretinin	100	100	90	84
WT1	93	ND	70	ND
HBME1	100	94	20	39
TM	91	84	90	84

悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別が困難な理由

- ・ 中皮マーカーによるマーカー検索が有効でない。
- ・ 的確に悪性中皮腫と反応性中皮を鑑別するマーカーが少ない。
- ・ 画像診断で体腔液貯留のみで、臨床的に早期と考えられる例では体腔液細胞診で悪性中皮腫に典型的とされる細胞所見が少ない。

悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別

悪性中皮腫の早期発見、および早期中皮腫像の解明には、初回提出の体腔液細胞診で、反応性中皮と悪性中皮腫を的確に鑑別することが重要である。

使用抗体

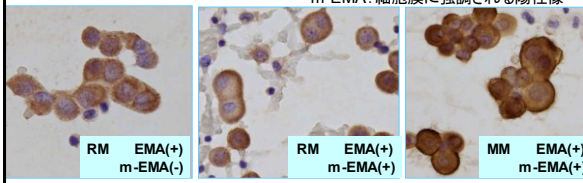
EMA	(Dako)
Desmin	(Dako)
CD146	(Invitrogen)
GLUT-1	(Millipore)

悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別 (1)

悪性中皮腫 (38例): 反応性中皮 (34例)

悪性中皮腫に対する特性	感度	特異度
EMA	97	32
m-EMA	86	74

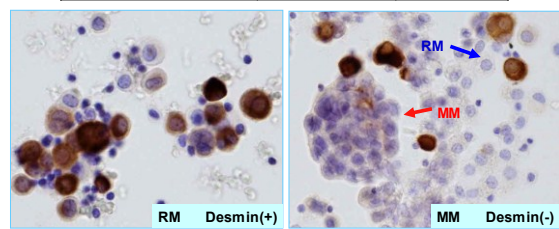
m-EMA: 細胞膜に強調される陽性像



悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別 (2)

悪性中皮腫 (18例): 反応性中皮 (23例)

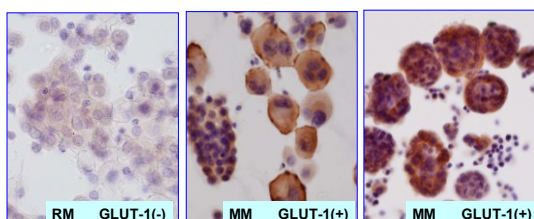
悪性中皮腫に対する特性	感度	特異度
Desmin(-)	50	78



悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別 (3)

悪性中皮腫 (12例): 反応性中皮 (10例)

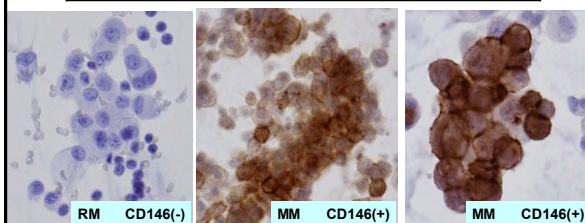
悪性中皮腫に対する特性	感度	特異度
GLUT-1(+)	92	80



悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別 (4)

悪性中皮腫 (20例): 反応性中皮 (22例)

悪性中皮腫に対する特性	感度	特異度
CD146	90	95

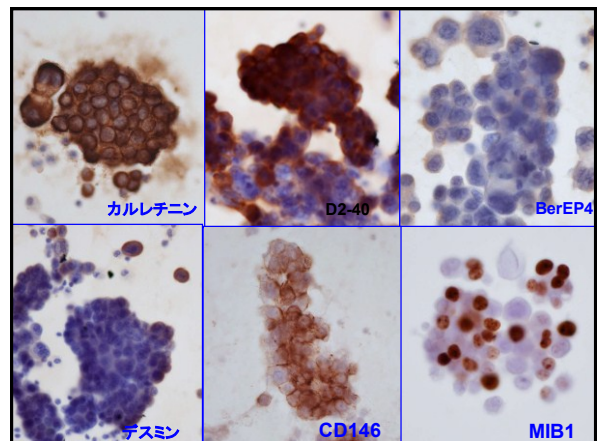
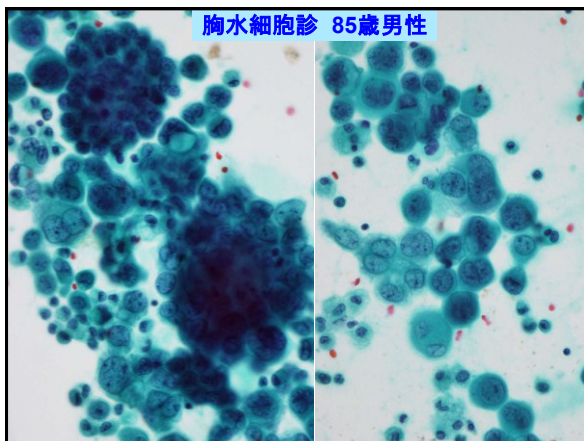
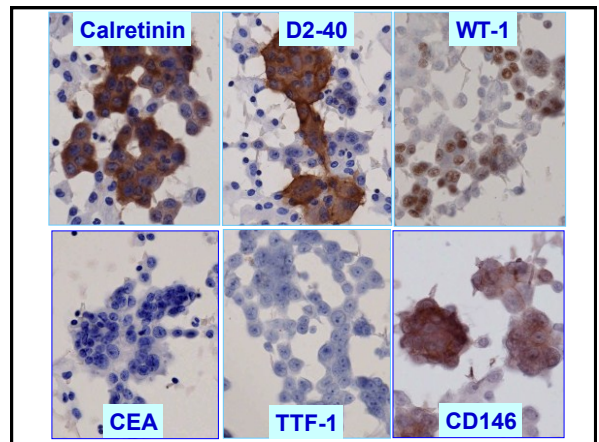
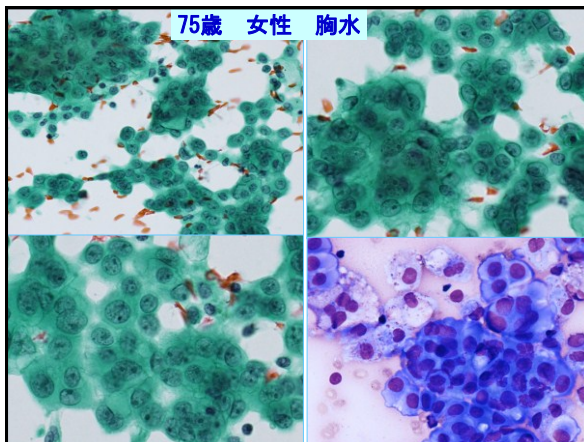


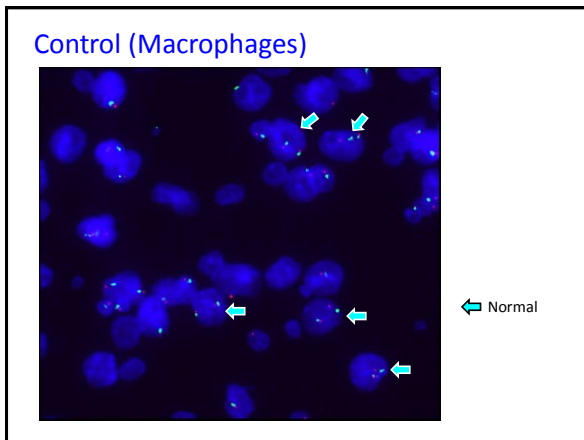
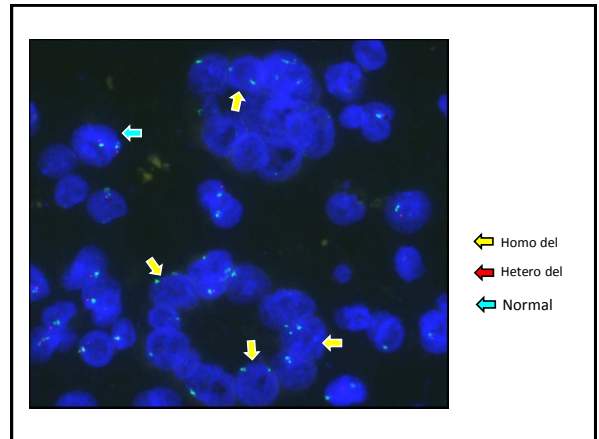
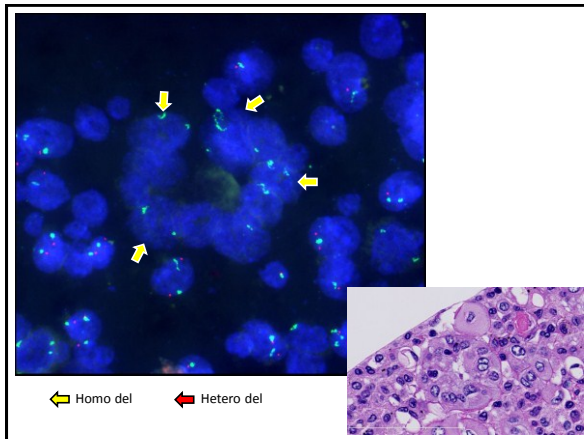
各抗体の染色特性

悪性中皮腫に対する特性	感度(%)	特異度(%)
m-EMA	85	80
Desmin(-)	63	81
GLUT-1	89	90
CD146	91	97

悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別ポイント

- **m-EMA**、**Desmin**ともに特異度は75%程度であり、絶対的なマーカーとは言えず、他のマーカーとの併用が望まれる。
- **GLUT-1**、**CD146**ともに、感度、特異度ともに高く、**鑑別マーカーとして有用である**。今後更なる症例の蓄積、検討が必要である。
- 悪性中皮腫例では同一標本内に反応性中皮の出現が少なからずみられるため、問題とする細胞を的確に捉えた上で判定を行なう必要がある。誤判定を防ぐためにも、形態学的特徴を十分認識しておくことも重要である。





FISH結果

Normal pattern	: 7.8%	(8/102)
Heterozygous deletion	: 3.9%	(4/102)
Homozygous deletion	: 88.2%	(90/102)

(85M 胸水セルブロック)

細胞診断: 悪性中皮腫(上皮型)

臨床病期分類

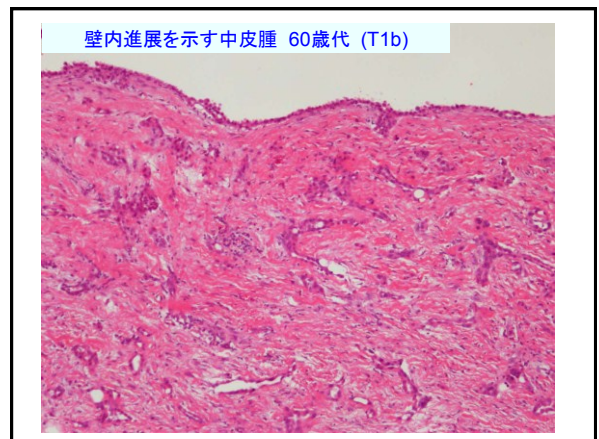
早期中皮腫

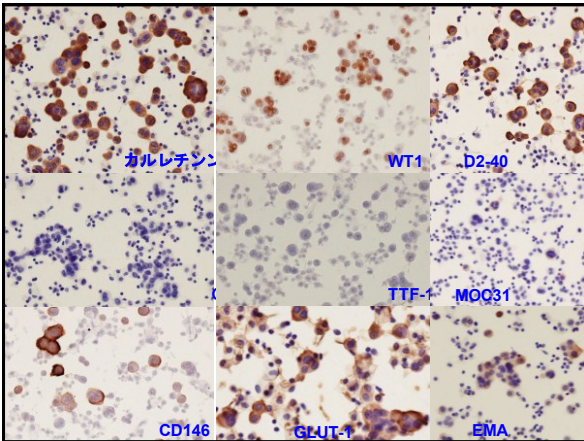
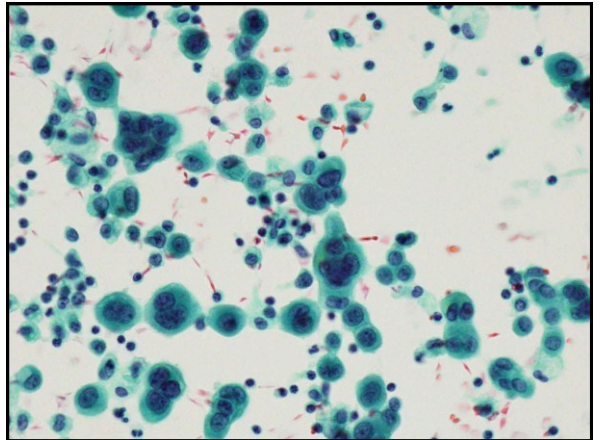
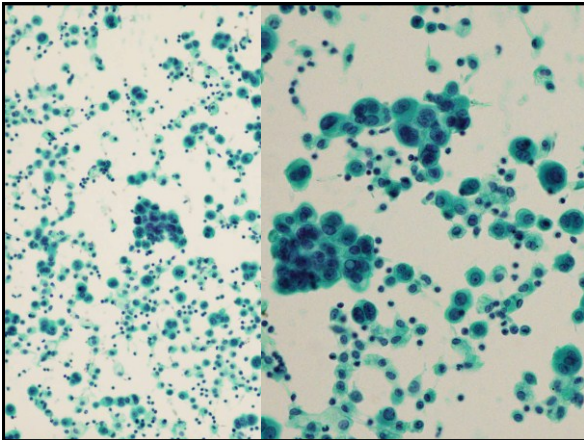
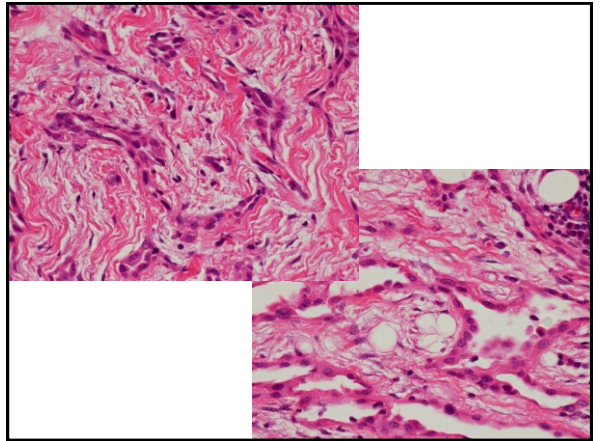
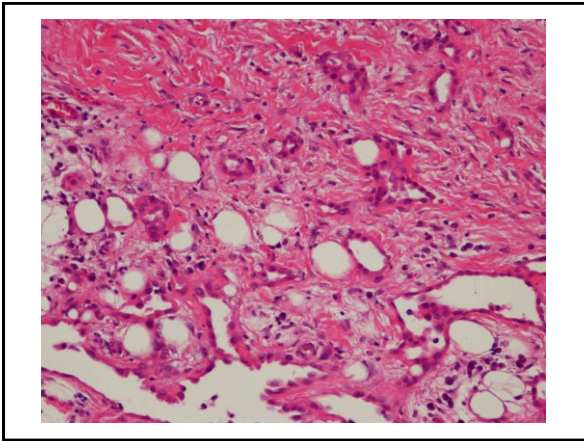
T1: 中皮腫が同側胸膜に限局
 T1a: 壁側胸膜だけに病変が存在
 T1b: 臓側胸膜にも散在性病変が存在

T2: 横隔膜筋層や胸膜直下肺実質などに浸潤を認めるが、
 胸壁の外弾力膜に浸潤を認めない

T3: 外弾力膜浸潤などの進行した病変がみられるが切除
 可能

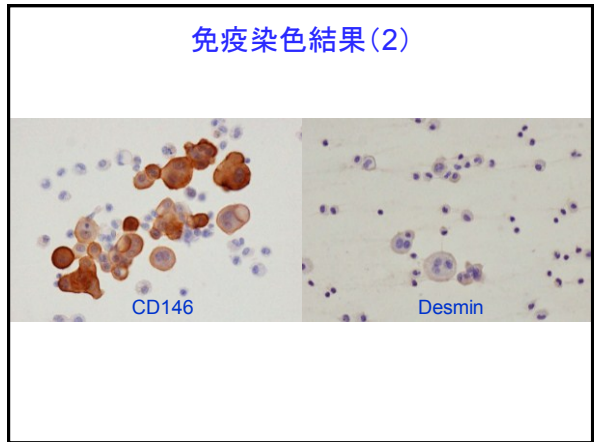
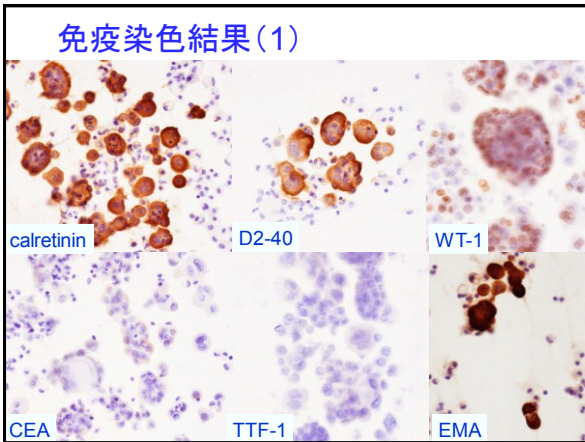
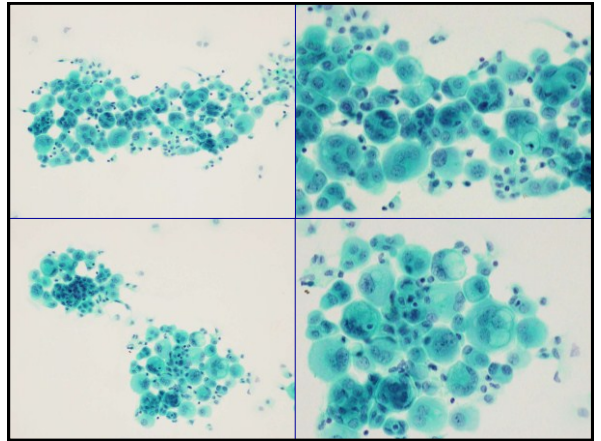
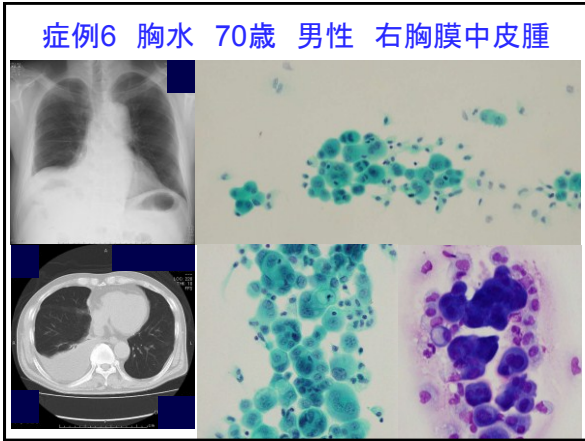
T4: 切除不能





中皮マーカー		共通マーカー		腺癌マーカー	
calretinin	2+	CK(AE1/3)	2+	CEA	-
WT-1	2+	EMA	2+	TTF-1	-
D2-40	2+		+	MOC31	-
			+		
CD146	+	GLUT-1	+		

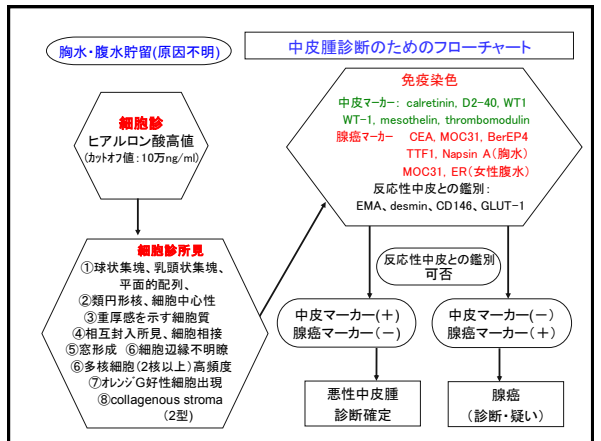
診断： malignant mesothelioma;
epithelioid type (tubulo-papillary)



頻度と平均出現個数について

	早期中皮腫		進行中皮腫	
	頻度	平均出現個数	頻度	平均出現個数
ヒアルロン酸様物質	20.0%	(8例/40例)	13.0%	(17例/126例)
球状集塊	80.0%	(32例/40例)	71.0%	(122/172例)
Collagenous stroma	42.5%	13.6個/全視野	43.6%	10.7個/全視野
hump	77.5%	17.8個/300個	79.4%	63.5個/300個
重厚感	92.5%	158.3個/300個	88.1%	138.3個/300個
オレンジG好性細胞	47.5%	1.6個/全視野	42.9%	9.6個/全視野
細胞辺縁不明瞭	67.5%	41.7/300個	77.7%	56.3個/300個
核数/細胞数	(1.31)	393個/300個	(1.26)	378個/300個
2核以上の出現率	95.2%	13.3個/50個	92.6%	14.3個/50個
多核の花弁状配列	15.0%	3個/300個	11.9%	0.9個/300個

☆感度90%以上を示すものは細胞質重厚感と2核以上出現率の2項目であり、早期中皮腫としての特徴を指摘することは困難ですが、一部の所見の出現率は低い。



結 語

- (1) 体腔液細胞診での細胞鑑別の要点について言及した。
- (2) 中皮腫細胞診の特徴と診断のポイントに加えて免疫組織化学的所見についても触れた。
- (3) 中皮腫細胞と反応性中皮との鑑別が今後重要になることを述べ、いくつかの新しい試みについて紹介した。
- (4) 中皮腫診断での重要課題として、早期診断が注目され、体腔液細胞診の分野でも、分子生物学的手法などによる確定診断が可能となり、患者のQOLの改善に寄与すべきものとする。