

心のう液より採取された腫瘍細胞培養の1例

—特に腫瘍形態像とその原発巣の推定について—

検査部病理 黒山祥文
八木弥八
大塚証一
倉澤百合子
滝口則子

I. はじめに

組織培養は、1907年、R.G. Harrisonの神経細胞培養から始まり、その後現在まで約80年間さまざまな研究が各分野においてなされ、報告されている。人癌細胞培養では、1952年Geyによって子宮頸癌からの培養により樹立された、Hela細胞をかわきりに、さまざまな人癌細胞株が樹立され、研究報告されている。さらに近年では、薬剤感受性試験・新制癌剤のスクリーニング試験及び免疫療法などの研究がなされてきている。しかし、これ等の細胞培養は、無菌的操作が必須条件であり、又、手技の難しさ、さらには臓器特異性により、個々の細胞の性格が異なり、一定の培養方法では十分に培養され得ない点、又一方、培養されたすべての細胞は、本来の性格を十分に持ち続けられ得ない点を考慮すれば、ルーチン検査に容易に取り入れられない事も納得できるように思われる。しかしその中でも、血液中のリンパ球や体腔液、即ち、胸水・腹水等に含まれる腫瘍細胞は、比較的培養が容易とされている。今回我々は、肺腫瘍患者から採取された心嚢液中の腫瘍細胞を培養したところ、比較的良好な培養成績が得られた。そこで、心嚢液中の腫瘍細胞と培養細胞を、細胞診的及び電顕的観察を行い、この両者の細胞形態的差異及び原発巣の推定を目的に比較検討したところ、若干の知見を得たのでここに報告する。

II. 症 例

患 者：65歳、男性

主 訴：顔面浮腫

既往歴：特記すべきことなし

現病歴：昭和63年8月頃、顔面浮腫にて当院呼吸器科へ受診。胸部X線上、気管下部右側より右主気

管支にかけて腫瘍を認めた(図1)。臨床的に肺癌と診断され、radiation (60 Gy 照射)を行うとともに、化学療法を行った。腫瘍は縮少傾向を示したため、一時退院したが、平成元年5月頃に、心嚢液貯留のため2回目の入院となった。そこで、心嚢液穿刺を行い、心嚢液約600 mlを採取した。又、腹部echo上、肝臓に巨大転移巣が認められるとともに、8月の胸部X線では、肺内に転移巣が認められた。この時点より、全身状態悪化し、8月30日に死亡。尚、剖検は行われなかった。

検査所見：2回目入院時の検査所見では GOT 55 U/l、GPT 38 U/l、CPK 377 U/l、CRP 3.45 mg/dl、LDH 446 U/l と高値を示した。又、腫瘍マーカーの CA 19-9 130 U/ml、TPA 2600 U/l、CEA 176.8 ng/ml といずれも高値を示した。喀痰細胞診では、atypical cell(-)、心嚢液細胞診では、atypical cell (+)であった。

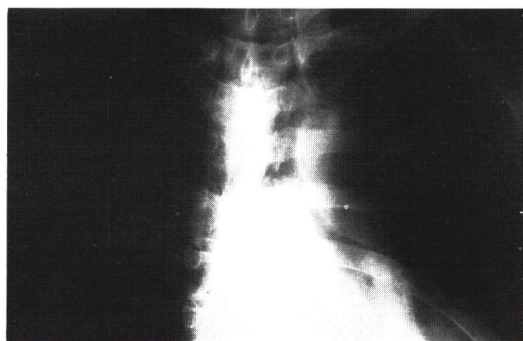


図1 胸部X線(平成元年7月6日)

III. 方 法

1) 培養方法

- ①培養容器：25 cm²/Tissue culture Flask slim type (CORING 社) を使用した。
- ②培養液：RPMI 1640 (GIBCO 社) の中に、ウシ胎児血清を 10% になるように加えた (10%FCS-RPMI)。又、初代培養のみ、雑菌汚染防止の為に、ペニシリン 100 U/ml (GIBCO 社) 及び、ストレプトマイシン 100 mg/ml (GIBCO 社) を 10%FCS-RPMI の中に加えた。
- ③培養条件：37°C、水蒸気飽和、空気 90~95%、炭酸ガス 10~5% の炭酸ガスふらん器中にて、静置培養した。
- ④検体：心嚢穿刺より採取された心嚢液約 600 ml を、無菌スピッツ管に分注し、1000 rpm、5 分間遠心分離操作を行い、buffy coat 層 (細胞層) 約 0.2 ml を、無菌的に採取したものを使用した。
- ⑤培養手技^{1),2)}：前述の検体を培養液 5 ml 入りの培養器中に浮遊させ、初代培養を実施した。約 1 週間目に、培養液を交換し、以後、約 1 週間ごとに培養液を交換した。培養開始より 13 日目に、培養器の底一面に増殖を認めた時点で、0.25%トリプシン (DIFCO 社) を用いて細胞分散を行った後、1,000 rpm、5 分間遠心操作後、その沈渣より、新しい細胞浮遊液を作製し、2 つの培養器に分注し、継代培養を行った。以後、培養容器一面に増殖を認めた時点で、随時継代培養を行った。約 4 カ月間の培養期間中に計 8 回の継代培養を行った (図 2)。

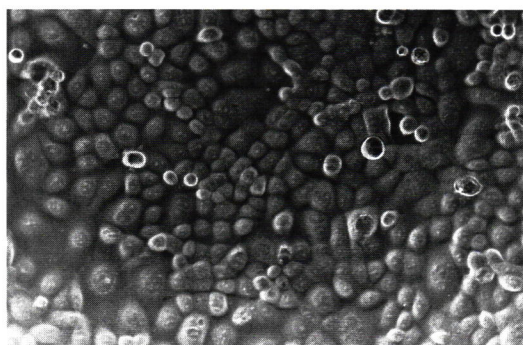


図 2 培養98日目の腫瘍細胞
(位相差顕微鏡、×100)

2) 検索方法

(A) 培養細胞の形態学的推移について

心嚢液及び培養細胞の塗沫標本を作製し、Papanicolaou 染色 (Pap 染色) と Giemsa 染色をした。細胞質長径及び短径、核長径及び短径をマイクロメーターにて計測し、グラフ上にプロットした。又、細胞学的特徴について検討した。(図 3、4)

(B) 電顕的検索

心嚢液遠心 (1,500 rpm、5 分間) 後の沈殿物と、約 4 カ月間培養した細胞を、2% グルタルアルデヒド及び 1% オスミウム酸 2 重固定、アルコール脱水、エポン 812 にて包埋、超薄切切片作製後、酢酸ウラニル溶液及び EDTA を添加した硝酸鉛の 2 重染色を行い、JEM 100 SX 透過型電子顕微鏡にて、形態学的に比較検討した。

(C) 組織化学及び免疫組織化学的検索

継代培養細胞を塗沫後、組織化学的には、95% アルコール固定を行い、以下の粘液染色を行った。又、免疫組織化学的には、冷アセトン固定後酵素抗体法 (ABC 法) にて、以下の免疫染色をした。

(粘液染色)

- ① PAS 染色及び、ジアスターゼ消化試験
- ② Alcian-blue 染色及び、ヒアルロニダーゼ消化試験
- ③ ムチカルミン染色
- ④ トルイジン青 (pH 4.1) 染色

(免疫染色)

- ① keratin (LIPSHAW/Immunon 社)
- ② CEA (LIPSHAW/Immunon 社)
- ③ Vimentin (LIPSHAW/Immunon 社)

(D) Cell Block 法を用いた検索

約 4 カ月間培養された細胞を、固定液 (エタノール中に、25% グルタルアルデヒド及び 10% 中性ホルマリンを添加した。) で固定後、アルコール脱水、パラフィン埋埋後、薄切切片作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施後、形態像及び細胞配列を観察した。

Papanicolaou 染色

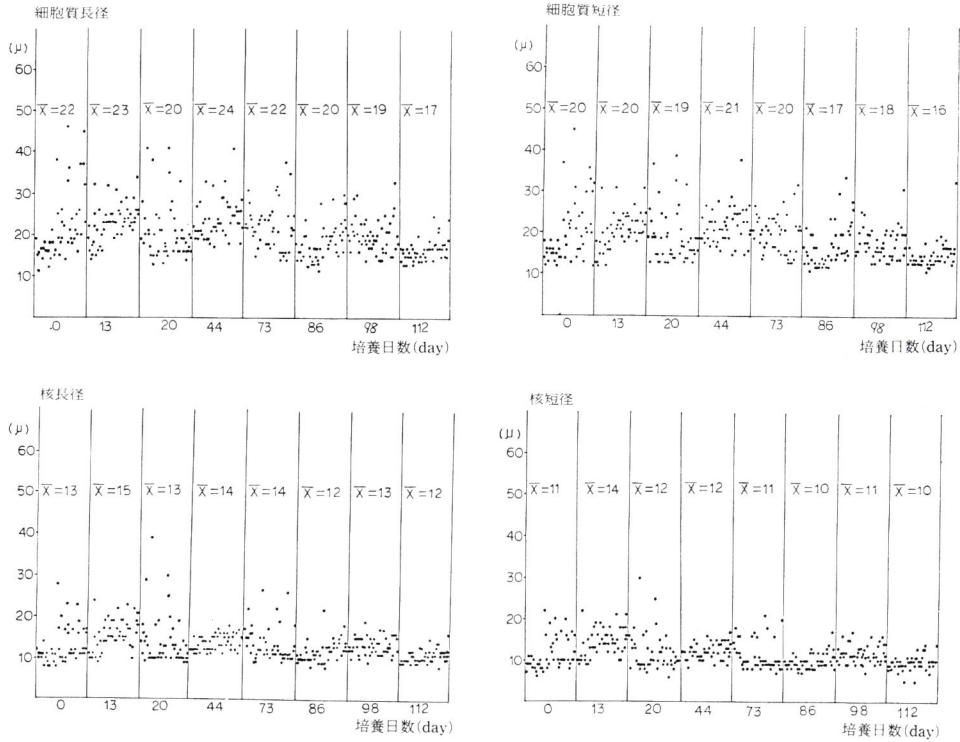


図3 腫瘍細胞の形態学的推移

Giemsa 染色

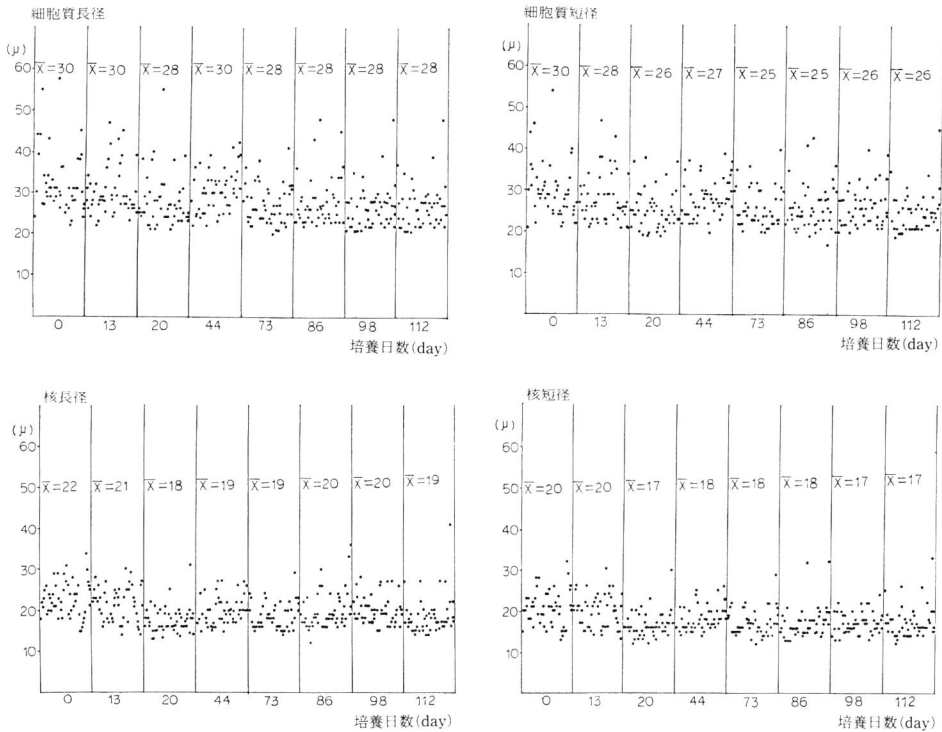


図4 腫瘍細胞の形態学的推移

IV. 結 果

1) 培養細胞の形態学的推移について

図3、4の如く、Pap染色、Giemsa染色を用いての腫瘍細胞の大きさ(平均値)は、ほぼ一定していた、即ち、細胞質長径 20μ 、短径 19μ 、核長径 13μ 、短径 11μ のところまで一定に推移していた。又細胞学的特徴としては、心嚢液中腫瘍細胞も培養細胞ともに、類円形の細胞であり、核はほぼ中心性に位置しており、核縁は円滑なものが多かった。核クロマチンは細網状で、1~2コの大型核小体を持ち、多核細胞もみられた。細胞質は、Pap染色で青染し、一部に粘液様空胞形成がみられた。細胞質辺縁は明瞭であった。結合性は比較的 loose で、巨細胞が孤立散在性にみられた。

2) 電顕的検索

表1の如く、心嚢液腫瘍細胞及び、培養細胞ともに変化を示さなかった。細胞質内には明瞭な分泌顆粒は認められなかった。又、培養細胞の方が良く固定されており、観察しやすかった(図5、6)。

3) 組織化学的及び免疫組織化学的検索

表2に示す如くであった(図7、8、9、10)。

4) Cell Block 法を用いた検索

形態学的には、前述のPap染色と似た形態像を示した。又、配列的には乳頭状様配列を示した(図11)。

以上の結果より、本症例は、肺原発で、乳頭状に増殖する腺癌であると推定できた。

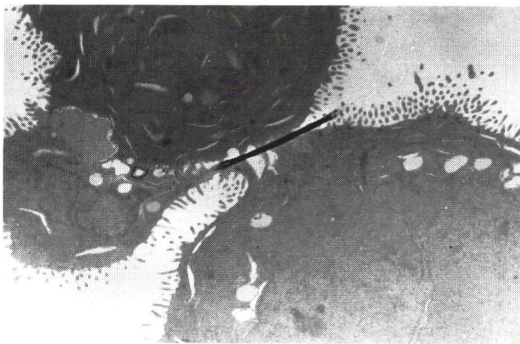


図5 心嚢液腫瘍細胞(×2,500)

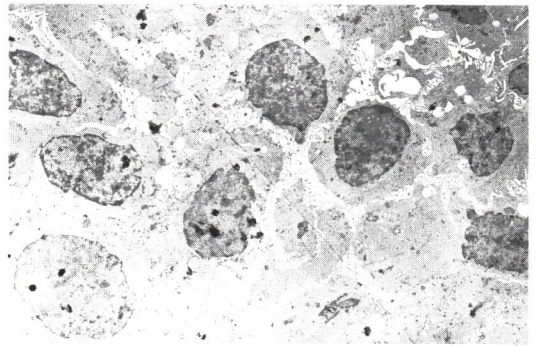


図6 培養112日目の腫瘍細胞(×1,500)

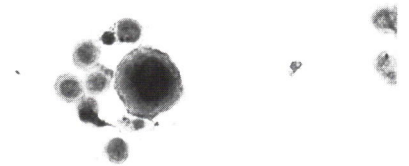


図7 培養細胞の Alcian-blue 染色(×100)



図8 ヒアルロニダーゼ消化試験後
(Alcian-blue 染色×100)

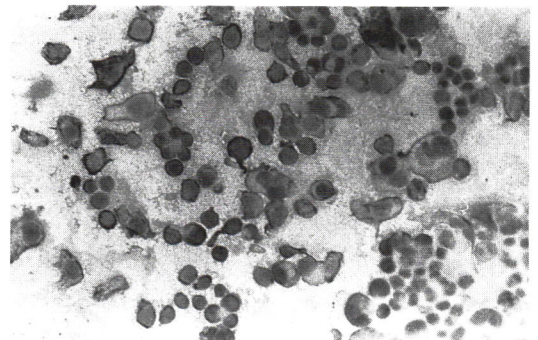


図9 CEA 染色(ABC法、×200)

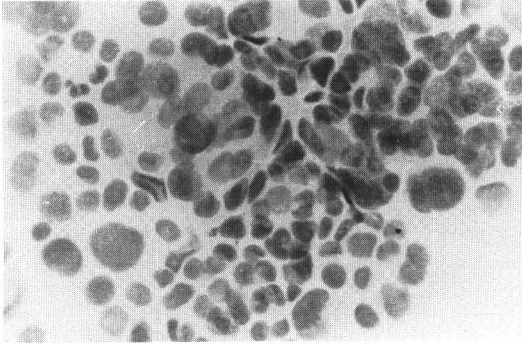


図10 Vimentin 染色 (ABC 法、×200)

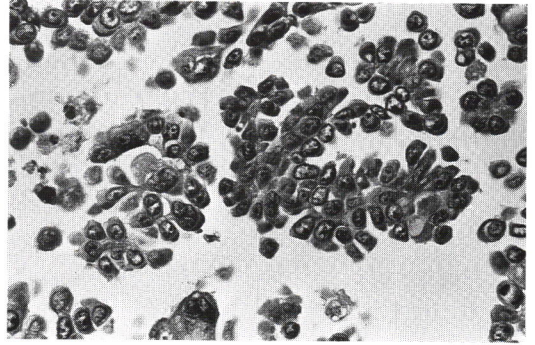
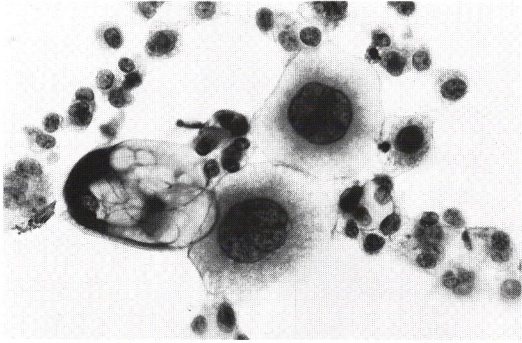
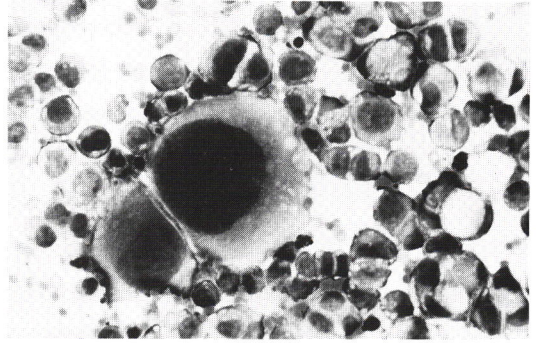


図11 Call Block による腫瘍細胞像 (H.E 染色、×200)



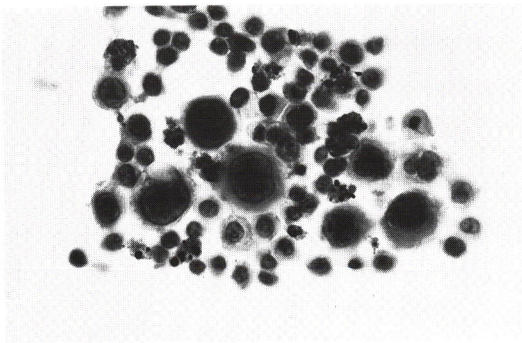
a



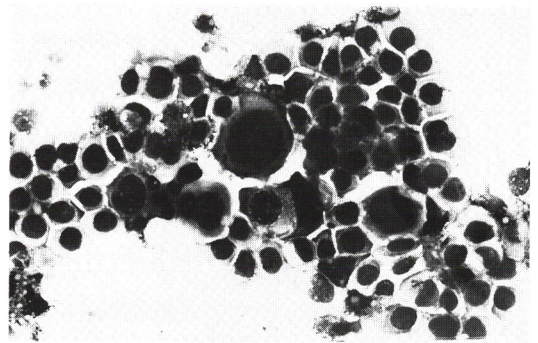
b

図12 心嚢液中腫瘍細胞

a . Pap 染色 (×200) b . Giemsa 染色 (×200)



a



b

図13 培養13日目の腫瘍細胞

a . Pap 染色 (×200) b . Giemsa 染色 (×200)

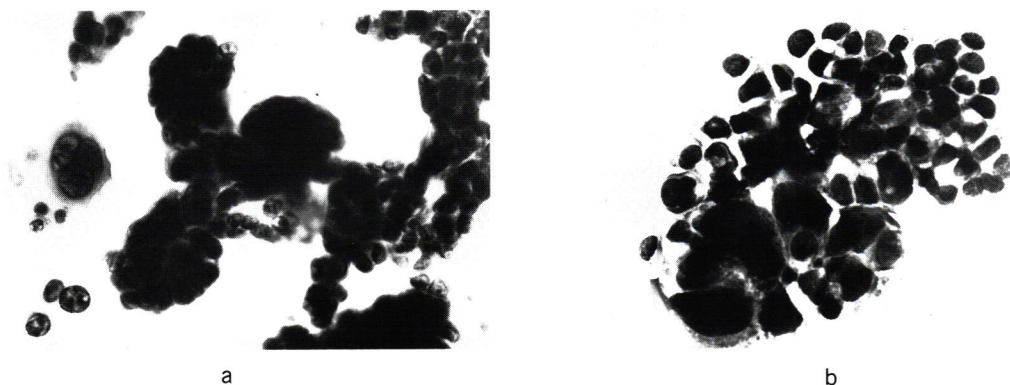


図14 培養86日目の腫瘍細胞

a. Pap 染色 (×200) b. Giemsa 染色 (×200)



図15 培養112日目の腫瘍細胞

a. Pap 染色 (×200) b. Giemsa 染色 (×200)

表1 電顕学的腫瘍細胞の特徴

心嚢液腫瘍細胞	培養細胞
<ul style="list-style-type: none"> 細胞質辺縁に多数の microvilli が認められた Lysosome が多数認められた 核の不整が強い 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞質辺縁に多数の microvilli が認められた Lysosome が多数認められた 核の不整が強い ヘテロクロマチンの増量

表2 組織化学及び免疫組織化学染色結果

染色	培養細胞
PAS	陽性
ジアスターゼ消化試験	抵抗性
Alcian-blue	陽性
ヒアルロニダーゼ消化試験	抵抗性
ムチカルミン	弱陽性
トリイジン青	陰性
Keratin	陽性
CEA	陽性
Vimentin	陰性

V. 考 察

大星、菅野らの報告¹⁾によれば、正常細胞の培養上での寿命は有限であり、ほぼ 50 回の分裂すなわち、50 代であるといわれている。一方、癌細胞は、HeLa 細胞に代表されるごとく、無限に増殖し続けられることが、知られている。今回の細胞培養でも、形態学的、細胞診的及び、電顕的に、心嚢液腫瘍細胞と培養細胞との間に、変化を示さなかったことは、上記の如く、癌細胞は無限に増殖し続けられることを示唆していると思われる。尚、現在も本症例の培養細胞は、培養が持続されている。

また、体腔液中の細胞診上、原発性腫瘍と転移性腫瘍の鑑別診断は、治療上最も重要である。特に、原発性腫瘍の代表的疾患は、悪性中皮腫であり、その細胞学的特徴は、森木らの報告³⁾によると、①異常に大きな集塊（マリモ状、乳頭状集塊）が多数出現する。②集塊中の細胞には、異型性の乏しいものが多いが、部分的に細胞密度が高く異型性（クロマチンの増量、大小不同、N/C 比は比較的大、核小体も大型で目立つ）を増し、分裂像がみられる。③孤立散在性に、多少とも異型性を示す、大型（巨大、多核）中皮細胞の出現がある。などの点があげられている。又、心嚢膜悪性中皮腫の特徴⁴⁾は、腺癌様配列の細胞集団と散在性に出現する線維肉腫様の 2 種類の細胞があるが、転移性腺癌との鑑別が非常に難しく、その鑑別には、組織化学的、免疫組織化学的及び電顕的検索が望ましい。そのうち、組織化学的鑑別は、① Alcian-blue 染色が陽性、ヒアルロニダーゼ消化試験で消化。② PAS 染色が陽性、ジアスターゼ消化試験で消化。③ ムチカルミン染色陰性。④ トルイジン青陽性（異染性）と、伊藤⁵⁾らにより報告されている。免疫学的鑑別は、Vimentin、Keratin、CEA に対する免疫活性の違いから鑑別できるとされており、一般的に、Vimentin は腺癌では陰性、CEA は中

皮腫で陰性という、森木ら³⁾の報告がある。電顕的鑑別として、①分岐を示す細長い microvilli が密生していること。②細胞質の filament が豊富である点だが、腺癌との鑑別に有用である。一方、悪性中皮腫を否定するための有用な所見として、細胞質内分泌顆粒や、microvillous core rootle の存在があげられると森木ら³⁾により報告されている。本症例も、細胞診的に中皮腫類似の所見を示したため、培養細胞を用いて、鑑別診断し、悪性中皮腫を否定し、転移性の腺癌細胞である可能性が大きく、臨床所見とあわせて、肺原発の腺癌であると推定出来たことは、細胞培養が細胞診へのはたす役割が大きいことが示唆された。今後は、体腔液中の細胞培養以外、固形腫瘍の培養や癌細胞による薬剤感受性試験への応用等も、可能にさせていきたいと考える。

VI. 結 語

65 歳、男性の心嚢液からの細胞培養で、比較的良好な培養成績が得られたので、形態学的推移を中心に報告し、原発巣の推定を検討した。

尚、稿を終わるに当たり、技術的御指導をいただいた、小児科森泰二郎先生に深謝します。

文 献

- 1) 大星章一・他：人癌細胞の培養，pp. 11～59，朝倉書店，東京，1975
- 2) 堀田進・他：組織培養，pp. 33～121，永井書店，大阪，1976
- 3) 森木利昭・他：悪性中皮腫の 1 例，日本臨床細胞学会雑誌，28：444，1989
- 4) 岩信造・他：悪性心嚢膜中皮腫の細胞診，日本臨床細胞学会雑誌，20：123，1981
- 5) 伊藤秀克・他：悪性胸膜中皮腫の 1 例，日本臨床細胞学会雑誌，22：628，1983