

## 総 説

### やさしい眼病理診断(5)

沖坂 重邦

眼病理教育研究所

#### IV 眼病理検査の手順(3) 特殊検査

組織病理診断の基本は、光学顕微鏡によるヘマトキシリン・エオシン(HE)染色を主体とする観察である。しかし、免疫組織化学、フローサイトメトリー、分子病理学、電子顕微鏡は特殊検査として腫瘍診断(発生源地)、病原体の確定診断などにも欠かせないものとなってきた。すなわち、光学顕微鏡による観察で判断に困難な場合には、これらの特殊検査を用いて総合的に判断して妥当な(適確な)診断をすることになる。

##### 1. 免疫組織化学<sup>1)~4)</sup>

抗原抗体反応の持つ特異性(specificity)と鋭敏性(sensitivity)を利用して、組織や細胞内に存在する物質を検出する方法が免疫組織化学的染色法(immunohistochemical staining)である。この方法による物質の検出の原理は、その物質に対する抗体を準備し、それを組織切片や塗抹標本に作用させて抗原抗体反応を行い、抗体の結合する部位から抗原物質の所在を知ることである。抗体自体もそのままではみえないので、あらかじめ顕微鏡下で観察可能なマーカーで標識したものをを用いる。よく用いられるマーカーとしては光学顕微鏡用の蛍光色素、光学顕微鏡・電子顕微鏡用の酵素、電子顕微鏡用のフェリチンである(図 1, 2)。

外科病理学で取り扱う光学顕微鏡的免疫組織化学的染色の対象は、組織標本および細胞標本である。組織標本としては、ルーチンに作製されるパラフィン切片が中心である。パラフィン切片では反応しないモノクローナル抗体を使用する場合には、凍結切片などを用いる<sup>4)</sup>。

免疫組織化学的方法によって検出される物質は大別すると、血清蛋白、ホルモンと関連物質、酵素、分泌成分、腫瘍抗原、腫瘍遺伝子産物と関連物質、組織・細胞および関連物質、病原体である<sup>1)</sup>。日常よく使用されているマーカーの種類と意義を列記する<sup>1)2)</sup>。

・keratin(cytokeratin)：上皮細胞における中間径線維を形成する蛋白の総称。扁平上皮癌などの上皮性悪性腫瘍(癌腫)を肉腫、リンパ腫、黒色腫と区別するのに有用。

・vimentin：間葉系細胞の中間径線維・細胞骨格を形

成する主要なポリペプチド。非上皮性腫瘍の診断に有用。

・actin, myosin：アクチンとミオシンからなるアクトミオシンは筋線維中の基本的収縮物質である。筋原性腫瘍(横紋筋肉腫、平滑筋肉腫)の診断、筋上皮の同定に有用。

・desmin：中間径線維中に存在する蛋白で、ビメンチンと共重合して結合組織、筋肉などの成分を形成する。筋原性腫瘍(横紋筋肉腫・平滑筋肉腫)の診断に有用。

・ $\alpha$ -SMA(smooth muscle actin)：平滑筋線維中の基本的収縮物質。平滑筋肉腫の診断(横紋筋肉腫には陰性)に有用。

・S-100 蛋白：ウシ脳より発見された 100% 飽和硫酸に可溶性の酸性蛋白。グリア細胞、シュワン細胞などの神経細胞だけでなく、母斑細胞、ランゲルハンス細胞、軟骨細胞、筋上皮細胞にも存在する。神経系腫瘍(神経膠腫、神経線維腫、神経鞘腫)、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍(顆粒細胞腫)の診断に有用。

・GFAP(glial fibrillary acidic protein)：線維性星状膠細胞に見出された 51 kd の細胞骨格蛋白。神経膠腫、上衣腫の診断に有用。

・NSE(neuron specific enolase)：ニューロンと神経膠細胞に存在するエノラーゼ。神経系腫瘍の診断に有用。

・HMB-45, MART-1：プレメラノゾームの糖蛋白に対する抗体。色素性母斑、悪性黒色腫の診断に有用。

・leukocyte common antigen(LCA)：白血球の細胞表面共通抗原に対する抗体。白血病、悪性リンパ腫の診断に有用。

・CD 79 a：B 細胞リンパ球の細胞膜表面抗原に対するモノクローナル抗体。B 細胞リンパ腫の診断に有用。

・CD 3：T 細胞リンパ球の細胞膜表面抗原に対するモノクローナル抗体。T 細胞リンパ腫の診断に有用。

腫瘍および腫瘍様病変のなかで比較的頻度の高い、あるいはしばしば鑑別診断上問題となることが多いものを便宜的に 4 群(小細胞性腫瘍、大細胞性腫瘍、多形細胞性腫瘍、紡錘細胞性腫瘍)に分類し、各々の群に属する腫瘍の鑑別を免疫染色で行う試みもなされている<sup>5)</sup>。

現時点で腫瘍における免疫染色の役割を要約すると下

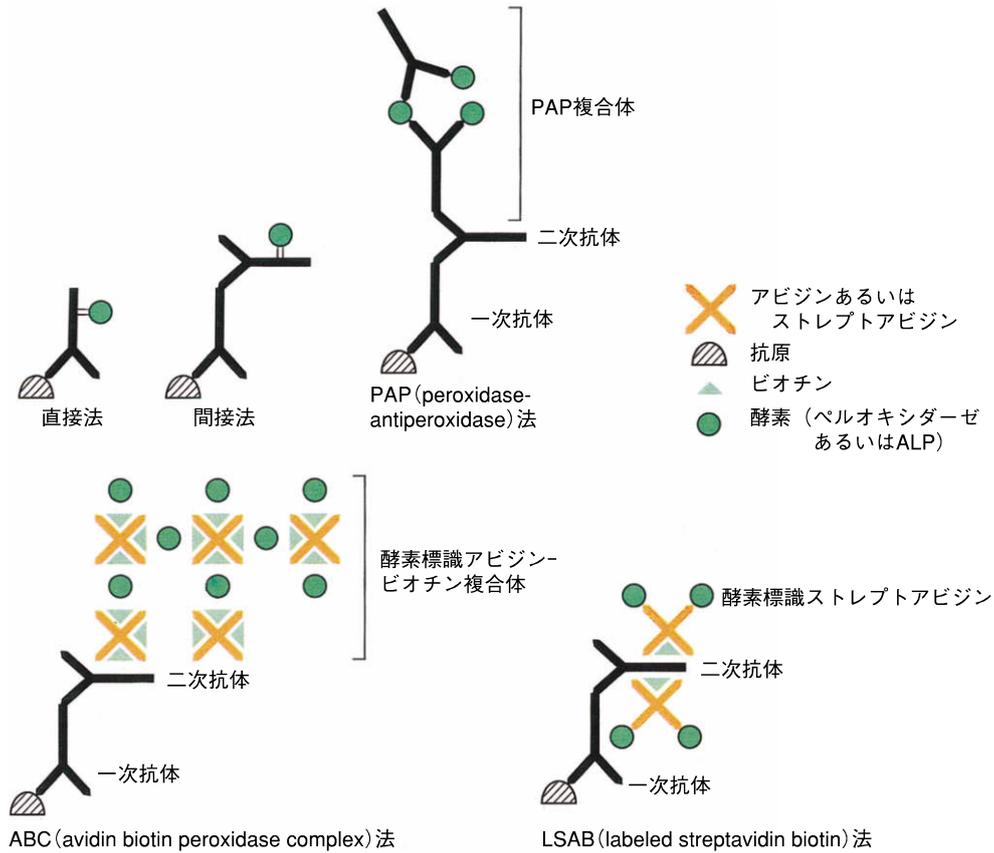


図 1 免疫組織化学(酵素抗体法)の原理(文献 10).

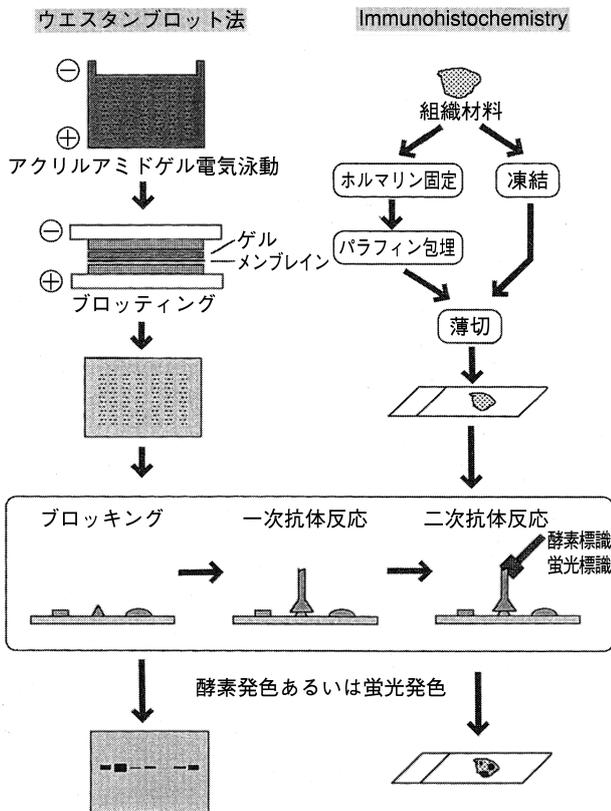


図 2 Western blotting 法と免疫組織化学の原理(文献 11).

記の 3 点である<sup>2)</sup>。

- ① 腫瘍全般にわたって、良性・悪性を鑑別するマーカーはまだ存在しない。
- ② 陽性ならば診断に有用であるが、陰性の場合には判断材料にならない。すなわち、陰性であるので〇〇ではない、とはいえない。
- ③ HE 染色での判断が免疫染色の結果より優先される。すなわち、免疫染色の結果が HE 染色の観察結果と矛盾する場合には HE 染色による判断が優先される。

2. フローサイトメトリー(flow cytometry)

個々に遊離した細胞を蛍光色素でラベルされた抗体と反応させた後に細い管を通過させる際、レーザー光を当ててその細胞から放出される散乱光や蛍光を感知して、個々の細胞の持つ性質を光学的パラメータとして測定して、細胞の大きさ、相対的な蛋白質量、抗原量、DNA 量などを明らかにしようとするものである。これらのデータをコンピュータソフトで解析し、細胞の数と蛍光の強弱などによる 2 つのパラメータによるヒストグラム、スキャッターグラム、3 つのパラメータによる三次元表示なども行われている。浮遊細胞を測定するため、一度に多数の細胞の解析が可能である。DNA 染色を行うことによる腫瘍細胞の DNA 倍数性パターン(間接的な腫瘍の悪性度)の検索、種々の抗体使用による白血病や悪性リンパ腫の免疫表現型診断、リンパ球系細胞のサ

ブセット, bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込みによる細胞の増殖, 細胞サイクルの解析などによく利用されている。また, 細胞が発する蛍光強度によって細胞や染色体を選別収集することができる機種も使用されている (セルソーター cell sorter)。

フローサイトメトリーの利点は, 標本中の個々の細胞の割合が定量的に表示されることであるが, 欠点は組織中の局在・分布を明らかにすることができないことである。フローサイトメトリーのデータは形態学的診断の補助的診断として有用である<sup>6)</sup>。

### 3. 分子病理学<sup>4)7)</sup>

免疫組織化学のように抗体を用いて分子そのものを検出する方法と同様に DNA あるいは RNA のような核酸レベルでの検出を可能にする手法が開発されてきている。目的とする DNA/RNA の存在を電気泳動の方法にて検出する Southern/Northern blotting 法, あるいは組織切片で mRNA の存在場所を標識方法に応じて検出する *in situ* hybridization が開発されている<sup>4)</sup>。また, 組織中に微量しか存在しない病原体を同様の *in situ* hybridization 法で検出する方法も行われている。この際その遺伝子の増幅手段として polymerase chain reaction (PCR) 法が用いられ, その増幅した後で, 標識した DNA probe を用いて病原体の検出ができる。

Western blotting 法は, ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した蛋白質を電氣的にニトロセルロースなどのメンブランに移動させ, その上で抗原抗体反応を行って目的とする成分のみを検出するものである (図 2)。この方法によって, 標的蛋白質の発現の有無, 発現量の違いを見ることができ, 蛋白質をメンブランに転写した後, 抗体の代わりに DNA プローブや蛋白質を用いて結合蛋白質を同定する方法も開発されている。

腫瘍細胞などによる物質の産生の直接的な証明として mRNA の検出も行われている。パラホルムアルデヒド固定凍結切片が主として用いられていたが, ホルマリン固定パラフィン切片も応用可能になってきている。用いるプローブをオリゴヌクレオチドにビオチン, ジゴキシゲニン, アルカリホスファターゼなどを標識したり, プローブを標識することなく紫外線照射により DNA を Fourier transformation (FT) ダイマー化し, 抗体で検知する方法も開発されてきている。

DNA の質的变化 (突然変異など) あるいは微量な mRNA を検出する方法として, パラフィン切片から PCR 法を用いて特異的な DNA の変化, あるいは特異的な DNA, mRNA を検出する方法も行われてきている。

悪性リンパ腫の診断は, 従来の形態学的所見や免疫染色による表現型 (phenotype) の検索に加えて, 遺伝子型 (genotype) の解析を併用して行われるようになってきている。眼窩, 結膜, 眼内に発生する悪性リンパ腫はほ

とんど B 細胞由来である<sup>6)</sup>。悪性リンパ腫の発症は癌遺伝子の活性化や抑制遺伝子の喪失が関係する。一部の B リンパ腫では, 染色体転座により重鎖遺伝子が癌関連遺伝子と再構成される。免疫グロブリン遺伝子の再構成は, 抽出した DNA を制限酵素で切断し, 免疫グロブリン遺伝子の一部 (一般には J または C 領域) をプローブとして Southern blot 法で検出する。B リンパ腫では通常 1 個の B リンパ球がモノクローナルに増殖するため各腫瘍ごとに特有な再構成バンドが認められる。

### 4. 電子顕微鏡<sup>8)9)</sup>

組織病理診断において透過型電子顕微鏡的検索が有用なのは, ① 腫瘍性疾患における細胞起源の検索, ② ウイルスその他の感染症の原因因子の同定, ③ 代謝性疾患, ジストロフィにおける沈着物の同定, ④ 免疫複合体の沈着の有無である。

電子顕微鏡的検索によって得られる細胞の微細構造から, その細胞の起源や分化の方向を同定することができる。この検索には, 上皮性・非上皮性腫瘍の鑑別が困難な場合の検索/光学顕微鏡レベルで細胞分化の不明な腫瘍の起源の検索/光学顕微鏡レベルで考えられた細胞起源の確認のための検索の 3 つがある。例えば, デスマゾーム, トノフィラメント, 基底膜, 微小絨毛を有する細胞内嚢胞, 分泌顆粒などは上皮性腫瘍を示唆する所見である。細胞質中に特徴的な神経分泌顆粒あるいはプレメラノゾームが証明されれば, 神経内分泌性腫瘍あるいは無色素性黒色腫と診断される。電子顕微鏡による所見のみから, 「腫瘍か否か」, 「良性か悪性か」を判定することはできない。

感染症, 特にウイルス感染症においては, 電子顕微鏡による検索はウイルス培養よりも早く診断がつく。ウイルス粒子やその封入体を見つければウイルスの帰属するグループの診断は容易である。

代謝障害性疾患, ジストロフィにおける沈着物の同定にも電子顕微鏡検索は有用である。Tay-Sacks 病, 糖原病, Fabry 病, Hurler 病, Gaucher 病, Nieman-Pick 病でそれぞれ特徴ある構造物がライソゾーム内にみられれば診断は確定する。

免疫複合体の沈着の有無も診断的価値が高い。

本総説の連載に当たり, 執筆の機会をお与え下さいました日本眼科学会編集委員会に深謝いたします。また, 執筆にご協力いただきました防衛医科大学校西川真平教授, 順天堂大学村上 晶教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 日本病理学会 (編): 病理技術マニュアル 4 病理組織化学とその技術, 149-277, 医師薬出版, 東京, 1986.
- 2) 原田美貴: 楽チン眼病理のすすめ—眼科医と病理医の連携をめざして—, 免疫染色を行う病理医の立場

- から, あたらしい眼科 17:517-524, 2000.
- 3) 浅野伍朗(監修): 診断・研究のための病理技術詳解 3. 免疫組織化学, 藤田企画出版, 東京, 1992.
  - 4) 長村義之: 外科病理マニュアル, 文光堂, 東京, 77-90, 1992.
  - 5) 長村義之(編): 病理と臨床 18 臨時増刊 免疫組織化学と *in situ* hybridization のすべて, 193-201, 2000.
  - 6) Zaldivar RA, Martin DF, Holden JT, Grossniklaus HE: Primary intraocular lymphoma, Clinical, cytologic and flow cytometric analysis. Ophthalmology 111:1762-1767, 2004.
  - 7) 木下 茂(監修): 眼科診療のための分子生物学入門, メディカル葵出版, 178-181, 東京, 1997.
  - 8) 日本病理学会(編): 病理技術マニュアル5 病理学領域における電顕応用, 医師薬出版, 東京, 1985.
  - 9) 林 暢紹: 楽チン眼病理のすすめ—眼科医と病理医の連携をめざして—, 電子顕微鏡観察は本当に役立つか?, あたらしい眼科 17:509-515, 2000.
  - 10) 赤木忠厚, 大朮祐治, 松原 修: カラーアトラス 病理組織の見方と鑑別診断, 第4版, 医師薬出版, 東京, 5, 2002.
  - 11) 横田 淳, 山本 雅: 分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール, 羊土社, 東京, 109, 1995.
-