


# 論文目録

報告番号	東大 乙 第	号	氏名	馬場紀行
論文				
1. 題目 「長期保存乾燥細胞診標本による乳癌ホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定」				
2. 印刷公表の方法及び時期				
(1) 平成 7 年 12 月 British Journal of Surgery 投稿中 (全文)				
"Immunostain of Estrogen Receptor and Progesteron Receptor on Air-dried Cytology of Breast Cancer Stored for Long Time" (英文)				
(学位論文を英訳)				
3. 冊数 1 編				
平成 年 月 日				
学位申請者				
馬場紀行 				

&lt;別紙1&gt;

## 論文の内容の要旨

論文題目 長期保存乾燥細胞診標本による乳癌ホルモン  
レセプターの免疫細胞化学的測定

氏 名 馬 場 紀 行

乳癌の治療法としての内分泌療法はその歴史が長く、近年においては優秀な抗ホルモン剤が開発されたこともあり、治癒手術後の補助療法あるいは進行、再発乳癌症例に対する集学的治療の一環として広く施行されている。内分泌療法の有効性は、乳癌細胞中に含まれるestrogen receptor(ER)、progesterone receptor(PR)の含有量と関係することが知られており、これらのホルモンレセプターを定量測定するためにDextran-coated-charcoal (DCC) 法、あるいはenzymeimmunoassay (EIA) 法検査を施行する必要がある。しかしこれらの定量測定法はいずれも検査手技が複雑で長時間を要し、また検査のためには0.5g程度の量の検体を消費する。定性的検査法である免疫染色においては、より少ない量の検体にも検査を施行することが可能であるが、新鮮凍結切片において施行された染色所見がより信頼性が高いといわれている。このため定量測定法の場合と同じく、凍結や-60℃以下の低温にて検体を保存するための設備と手間を要する。これらの検査法では小腫瘍症例、切除不能症例におけるホルモンレセプター測定検査は施行することが困難であった。これらの問題を解決し、より多くの施設におけるER、PRの測定を可能とするためには、従来の方法より測定操作が簡便でdeep freezer等による保存を要さず、少ない標本量にも実施可能なレセプター測定検査法の開発が必要である。免疫染色のために長期間保存された乾燥細胞診標本を用いることがもし可能となればこれらの問題点は解決可能であると考えられた。そこで本研究においては、長期間乾燥細胞診標本を保存しても、不安定な抗原の変性が軽度でER、PRの免疫細胞化学的な測定が可能と

なるような固定、保存法の開発を目指した。

まずER、PRの免疫染色のために適した固定液を決定するために、Carson液、4% Paraformaldehyde in phosphate buffer, pH7.4 (PFA)、Zamboni液、95% ethanol にて乳癌捺印細胞診標本を固定し、抗ER、抗PRラットモノクローナル抗体（いずれもAbbott, Chicago, USA）にて免疫染色を施行し、ER、PRの染色所見を比較した。その結果Zamboni液にて固定すると最も鮮明な免疫染色結果がえられることが明らかとなった。

次いで、固定後の乾燥細胞診標本をCrawfordらが考案した検体保存液内に入れて-20℃の温度にて保存してから免疫染色を施行し、染色所見の経時的変化について検討した。また条件を変えて、検体保存液の代わりにPBS内に入れて4℃の温度にて保存、あるいは未固定の細胞診標本をPBS内に入れて4℃にて保存、検体保存液内に入れて-20℃にて保存する4通りの方法で細胞診標本を固定、保存した後免疫染色を施行し、ER、PRの染色所見を比較した。その結果、固定後検体保存液内につけて-20℃にて保存した場合においてのみ、保存開始後8週間以上経過しても免疫染色による正確なER、PRの同定が可能であることが明らかとなった。

以上のことから長期間保存された乾燥細胞診標本を用いて免疫染色にてER、PRを同定するには、まず細胞診標本をZamboni液で固定することが重要であり、固定後の標本を検体保存液中に入れて-20℃の温度で冷蔵すればよいと結論した。

このような結果をもとに決定された固定、保存法を26例の乳癌症例より作製された乾燥捺印細胞診標本に施行し、経時的にER、PRの免疫染色を行い染色所見を観察した。その結果免疫染色の所見は、保存後8週以上の期間においても信頼性が高く、また新鮮凍結切片を材料として施行された免疫染色所見とよく一致すること確認された。しかし定量検査法であるEIA法とは、PRに関して結果が一致しない症例が2例あった。これは免疫染色法が腫瘍組織におけるER、PRの存在を肉眼的に確認できる検査法であるのに対して、定量検査法はレセプター量を間質も含んだ全腫瘍組織における単位タンパク量あたりに平均化して計算するためであると考えられた。

次いで本法の臨床応用を試みた。まず20例の乳癌症例の穿刺吸引細胞診標本を外來診察時に採取し、後日これを免疫染色してER、PRの同定を行い、手術あるいは生検によってえられた切除標本より作製した凍結切片における免疫染色所見と比較した。その結果、sensitivity, specificity いずれも満足のいく結果をえることができた。

次に、検査用の検体の確保が難しく従来の方法ではER、PRの測定検査が困難であった8例の小腫瘍症例に対し、捺印あるいは穿刺吸引細胞診標本を用いたER、PRの免疫細胞化学的同定を試みた。腫瘍径わずか5mmの症例からも多数の乾燥細胞診標本を作製することが可能であり、ER、PRの同定は容易であっ

た。今後は小腫瘍乳癌症例のER、PR測定検査はこのような免疫細胞化学的方法が望ましいと思われた。

最後に切除不能病巣から穿刺吸引細胞診標本を採取し、免疫染色によるER、PRの同定を試みた7例の症例を呈示した。穿刺吸引細胞診検査はかなり状態の悪い症例に対しても安全に施行可能であり、このようにしてえられた細胞診標本を免疫染色することにより、合理的な内分泌療法を選択することが可能になるであろうと期待された。

この研究によって開発された長期間保存した乾燥細胞診標本をER、PRの免疫染色に用いるための固定法、保存法は手順が簡便で特殊な機器や薬剤を必要としないので多くの施設で直ちに導入可能である。本方法によれば従来免疫染色用の標本としては不適当とされていた乾燥細胞診標本を用いて、標本固定後通常型の冷蔵庫内で2か月以上保存した場合においても信頼性のある免疫染色所見がえられ、正確にER、PRの同定が可能である。従来の定量測定法や新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学的同定法と比較して、乾燥細胞診標本を用いたER、PRの免疫細胞化学的同定法は乳癌診療上より実用性に富む画期的な方法であると考ええる。



<別紙2>

論文審査の結果の要旨

氏名 馬場紀行

本研究は、乳癌の内分泌療法に適応を決定する上で重要な腫瘍組織中のホルモンレセプターの測定検査を簡易化するために、従来免疫染色の材料としては不適当であると考えられていた長期保存された乾燥細胞診標本を材料として用い、免疫細胞化学的にホルモンレセプターを同定することが可能となるような標本の固定法、保存法の考案と臨床応用を目的としてなされた研究である。特殊な試薬や装置の使用を避け、保存温度条件を deep freezer を要さない-20℃程度として設備に恵まれない一般的な施設における幅広い普及を目指した点に独創性がある。本論文においては、先ず乳癌症例の切除標本より多数作製した捺印細胞診標本を冷風乾燥後、固定、保存に関する条件を変えて長期間保存し、信頼性のある免疫細胞化学的なホルモンレセプターの同定が可能となるような固定、保存法について検討した。また、このような実験結果から最適と考えられた固定、保存条件に保存された多数例の乾燥捺印細胞診標本を経時的に免疫染色し、信頼性の向けホルモンレセプターの同定が可能である保存期間の長さについて検討した。さらに臨床応用として、外来診察時に採取された穿刺吸引細胞診標本を材料としたホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定、小腫瘍症例よりえられた細胞診標本を用いたホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定、切除不能症例より採取された穿刺吸引細胞診標本を用いたホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定を試みた。研究結果は下記の通りである。

1. 未固定の乾燥細胞診標本を-20℃の温度で長期保存するとホルモンレセプターの抗原活性は維持できず、免疫細胞化学的な同定は不可能となることが判明した。
2. 乾燥細胞診標本におけるホルモンレセプターの抗原活性を長期間維持するためにはまず固定（特にZamboni 液固定がよい）し、次いで検体保存液（PBS+Glycerol 等量混合

液ベース) 内に浸けて-20℃にて冷蔵することが重要であることが示された。

3. 2. の条件で固定保存された乾燥細胞診標本を材料として用いたホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定結果は、新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学的同定結果や、組織抽出液を用いたEIA法による定量測定結果とよく一致し、8週間以上保存しても信頼性のある同定結果がえられることが示された。

4. 外来診察において、腫瘍穿刺吸引細胞診標本を用いればホルモンレセプター量の精度の高い術前評価が可能であるが、腫瘍組織中におけるレセプター分布の不均一性により false negative と判定する危険があることに注意せねばならないことが示された。

5. 腫瘍径の小さな症例においても、腫瘍捺印細胞診標本を用いれば殆ど検体を消費することなく正確なホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定ができるので、病理組織診断に支障をきたすことなくレセプターを同定することが可能であることが示された。

6. 切除不能の進行、再発乳癌症例においても穿刺吸引細胞診標本を用いたホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定が可能であり、内分泌療法への適応を合理的に決定することが可能であることが示された。

以上本論文は基礎的な研究として、従来免疫染色の対象としては不適当とされていた乾燥細胞診標本をZamboni 液にて固定し、検体保存液内に浸けることによって、一般に普及している冷蔵庫の冷凍温度である-20℃前後の温度帯で8週間以上保存しても正確な乳癌のホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定が可能であることを示した。特にこの固定法、保存法を施行された乳癌乾燥細胞診標本におけるホルモンレセプターの免疫細胞化学的同定結果が、新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学的同定結果とよく一致することを示すことにより、従来のホルモンレセプター検査と比較して信頼性の点で遜色がないことを示している。また、乾燥細胞診標本を作製、固定、保存する際に特殊な試薬や器械を用いることなく手技的にも極めて簡便となるように工夫したことで、多くの一般的な施設での外来診察における乳癌のホルモンレセプター検査を可能とし、臨床的な実用性が高いことが示されている。将来、乳癌治療においては、治療方針の決定や予後を予測するための指標となる因子やマーカーを手術前に評価することが重要視され、

また診断法の進歩により腫瘍径の小さな早期症例が増加することが予想される。乾燥細胞診標本を用いた免疫細胞化学的同定法は、簡便で正確な術前評価の手段として、また早期症例から多くの治療、予後に関する情報を収集するための手段として非常に有用であろうことが予想される。また、これまで検査用の検体をえることが困難であった切除不能の進行、再発乳癌症例においてもホルモンレセプター検査が可能となり、内分泌療法の適応を的確に決定できることを実例をあげて示しており、ホルモンレセプターに関する情報不足からともすれば合理性を欠いていたこれらの症例に対する集学的治療の指針決定に布石を投じている。

以上本論文は、乾燥細胞診標本を免疫染色の材料として用いることで細胞診領域における免疫染色の適応を拡大し、乳癌を例として治療方針や予後を考慮する上で重要な情報を細胞診標本にて容易にスクリーニング可能であることを明らかにし、将来の細胞診業務内容の新たな発展の可能性について示唆を与えている。さらに、随所に臨床応用を意図した研究姿勢が認められ、本研究の成果が今後乳癌診療を始めとする臨床分野において多大の貢献をなすと予想される。よって本論文に対し学位を授与するに値するものと考えられる。

<別紙3>

試験の結果の要旨

氏名 馬場紀行

審査委員は論文提出者に対し、学位請求論文の内容及び関連事項について質疑と討議を行い、本人の学識と提出論文とを審査した。その結果、審査委員全員により、平成 年 月 日に合格と判定した。

<別紙4>

学力の確認の結果の要旨

論文提出者は、昭和 61 年1月実施の外国語試験（英語、独語）の筆記試験に合格した。審査員5名は、論文提出者に対し、口答による学力検査を行った結果、本大学院において博士課程を修了して学位を授与されるものと同等以上の学識と学力を有すると認め、優の判定をした。

## 審 査 委 員 会 報 告 書

報告番号		授 与																									
学位記番号	乙 第                  号	年月日	平成    年    月    日																								
学位の種類	博士（医学）																										
氏                  名 <small>ふりがな</small>	はば                  のりゆき  馬場                  紀行																										
論文題目	長期保存乾燥細胞診標本による乳癌ホルモンレセプターの  免疫細胞化学的同定																										
主論文の冊数	1 冊																										
審 査 委 員 会 委 員	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>(官職)</td> <td>(氏名)</td> <td>(印)</td> </tr> <tr> <td>主査</td> <td>東京大学教授</td> <td>町並 陸生</td> <td></td> </tr> <tr> <td>副査</td> <td>同上</td> <td>芳賀 達也</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>東京大学助教授</td> <td>坂本 穆彦</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>同上</td> <td>松谷 章司</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>東京大学講師</td> <td>松本 俊夫</td> <td></td> </tr> </table>				(官職)	(氏名)	(印)	主査	東京大学教授	町並 陸生		副査	同上	芳賀 達也			東京大学助教授	坂本 穆彦			同上	松谷 章司			東京大学講師	松本 俊夫	
	(官職)	(氏名)	(印)																								
主査	東京大学教授	町並 陸生																									
副査	同上	芳賀 達也																									
	東京大学助教授	坂本 穆彦																									
	同上	松谷 章司																									
	東京大学講師	松本 俊夫																									
論文の内容の要旨 審査の結果の要旨 試験の結果の要旨 学力の確認の要旨	別紙 1 別紙 2 別紙 3 別紙 4																										
審 査 委 員 会 の 意 見	審査の結果、博士（医学）の学位を授与できると認める。																										



長期保存乾燥細胞診標本による乳癌ホルモン  
レセプターの免疫細胞化学的同定

馬場 紀行

③

# 長期保存乾燥細胞診標本による乳癌ホルモンレセプターの 免疫細胞化学的同定

馬場紀行

## [緒論]

乳癌の臨床細胞診は軟線撮影や超音波診断と並ぶ補助診断法の一つとして位置づけられている。細胞診は従来の検査法と比較してより直接腫瘍から情報をえられる利点があり、最近では単なる良悪性のスクリーニングにとどまらず乳癌の病理組織型や臨床的悪性度にも踏み込んだ診断が試みられるに至っている。細胞診標本を材料として免疫染色を行い、診断や治療に役立てようとする機会も多くなってきた。しかし免疫染色は手技がやや複雑で手間がかかるため、迅速なスクリーニングが業務の柱となっている細胞診領域での普及はさほど進んではいない。これには免疫染色にて信頼できる染色結果をえるためには、採取後直ちに湿固定された細胞診標本に染色を行うことが必要だと考えられていたことも原因している。

一方以前より乳癌の治療法として卵巣摘出術<sup>1</sup>や副腎摘出術<sup>2,3</sup>などの内分泌療法が有効なことが知られていた。近年においては、内分泌療法は(2)-2-

[p-(1,2-diphenyl-1-butenyl) phenoxy]-N,N-dimethylethylamine (Tamoxifen)<sup>4</sup>, medroxy progesterone acetate (MPA)<sup>5</sup>などを用いた薬物的方法が外科的内分泌療法にとって代わり、乳癌手術後の補助的治療法<sup>6</sup>として、あるいは進行、再発乳癌の集学的治療法<sup>7,8</sup>の一環として広く施行されている。内分泌療法の有効性は、腫瘍細胞中のホルモン受容体<sup>9</sup>の有無と関係があり、腫瘍細胞にestrogen receptor (ERと略記する)、progesterone receptor (PRと略記する)が存在する症例に対しては内分泌療法がより奏功することが期待できる<sup>10</sup>。従って内分泌療法の適応を決定するためには、乳癌細胞中のER、PR量を定量的、あるいは定性的に測定する必要がある。

ER、PRの測定法としては組織抽出液を用いた生化学的ないし免疫学的方法と、組織標本を用いた免疫組織化学的方法とがある。このうちER、PRの定量的測定〔binding assayであるDextran-coated-charcoal (DCC)法<sup>11</sup>、あるいは

は enzyme immunoassay (EIA) 法<sup>12)</sup> を施行するには0.5g程度の検体量を消費し、検体を測定に供するまで -60℃ 以下の低温にて保存する必要がある<sup>11)</sup>。また検査のためには分光光度計等多数の特殊な器機と時間を要する。従って腫瘍径の小さな早期乳癌症例や切除不能な進行、再発乳癌症例では測定のために十分な検体をえることができないため、従来の方法ではER、PRの測定検査を施行することが不可能な場合があった。一方定性的測定方法である免疫染色法では検体量は少なくすむが、染色の対象となる抗原物質の中には常温にて不安定なものがあるために、新鮮凍結切片を用いてえられた所見がより信頼性があり、ホルマリン固定パラフィン切片の信頼性はこれに比べて低いといわれてきた<sup>13,14)</sup>。従って急速凍結や冷凍保存のために液体窒素や deep freezer 等を用意しなければ信頼のおける測定結果を得ることは困難であった。

細胞診は少量の腫瘍組織からでも多数の標本作製することが可能であり、切除不能症例からでも細注射針による穿刺吸引 (fine needle aspiration, FNA と略す)、あるいは腫瘍組織にプレパラートを擦過 (touch)、捺印 (imprint) することにより標本作製することが可能である<sup>15)</sup>。しかし始めに述べたように、これまでは細胞診標本を用いてER、PRを免疫染色法にて同定するためには、標本作製後直ちに固定して免疫染色を施行するか、染色施行時まで -60℃ 以下の温度で保存しなければならないとされていた<sup>16)</sup>。臨床場においては、細胞診検体を作製した後免疫染色施行まで保存をしなければならない場合の方が多いので、従来の方法では凍結切片を用いた免疫染色の場合と同様の低温保存のための機器を要する。もし湿固定細胞診標本より作製が容易な乾燥細胞診標本を用いて、固定、保存法を工夫することにより一般用冷蔵庫にても許容可能な -20℃ 程度の温度帯にてER、PRの抗原活性を長期間維持することができれば、それは臨床上非常に有用であると考え

られる。

本研究においては以上のような背景のもとに、先ず乾燥細胞診標本を長期間、抗原性をなくすことなくER、PRの免疫染色用に保存するための方法の開発を試みた。具体的には、乳癌切除標本より多数作製した乾燥細胞診標本を、種々の方法により固定、保存した後経時的に免疫染色した。その結果、乾燥細胞診標本を4% Paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4<sup>17</sup> (PFAと略記する) またはZamboni液<sup>18</sup>にて固定後、特定の検体保存液<sup>19</sup>に浸けて-20℃の温度で冷蔵した場合、2カ月以上の保存の後でも免疫染色によるER、PRの同定が可能であること、また多数例にて検討した結果その同定結果が凍結切片における免疫組織化学的同定結果やEIA法による定量結果とよく一致することを明らかにした。次いで本法を臨床応用してa. 切除前に採取した腫瘍穿刺吸引細胞診標本を用いたER、PRの免疫細胞化学的同定、b. 小腫瘍症例の細胞診標本によるER、PRの免疫細胞化学的同定、c. 切除不能症例の穿刺吸引細胞診標本を用いたER、PRの免疫細胞化学的同定を試み、今回開発した方法が臨床上有用かつ実用的であることを示した。

#### [症例と方法]

[症例] 1991年9月より1992年10月にかけて東京共済病院にて手術、あるいは生検のために切除標本をえられた乳癌症例のうち、検討のために必要な数の乾燥細胞診標本を作製しえた計26症例を検索した。

[細胞診標本の作製] 図1. に示した手順に従って細胞診標本を作製した。具体的には、手術、生検のために切除された腫瘍組織の中心部に割を入れ、その断面から0.02% poly-l-lysineを塗布したスライドガラス上に多数の捺印細胞診標本(imprint cytology)を作製し、直ちに冷風にて乾燥した。

固定液は、染色所見を比較するためにPFA、Zamboni液、Carson液<sup>20</sup>、



95% Ethanolを使用した。図2にPFA、Zamboni液、Carson液の調整法について示す。全ての固定液の固定条件は 4℃、10 分間とした<sup>21</sup>。また長期間乾燥細胞診標本を保存してもER、PRの免疫染色による同定が可能であるような固定、保存の方法を決定するために、標本の固定、保存は以下に述べるA法～D法の4つの異なる方法で行い、経時的に免疫染色所見を比較した。

(A 法)固定後 PBSにて洗浄し、検体保存液 (PBS : Glycerol 1 : 1, Sucrose 0.25M / l, MgCl<sub>2</sub> 3mM / l)の中に浸けて -20℃の温度で冷蔵した。この検体保存液は新鮮切除標本を-20℃にて保存する際にER、PRの活性低下を軽度にする目的で、Crawfordらにより考案されたものである<sup>19</sup>。免疫染色直前にPBSにて洗浄し、PFA、Carson液、Zamboni液を用いた場合にはさらにこの時点で -20℃のMethanolにて5分間、-20℃のAcetoneにて3分間の固定を加えた(後固定)。

また 固定、保存の条件を変えて、

(B 法)固定後PBSに浸けて 4℃にて保存し、後固定後染色を施行する、

(C 法)固定せずにPBSに浸けて 4℃にて保存し、染色施行直前に固定する、

(D 法)固定せずに検体保存液内に浸けて -20℃にて保存し、染色施行直前に固定する、

計4通りの方法によるER、PRの免疫染色所見を経時的に比較し、最良の固定、保存法について検討した(表1)。

またこの検索によって最良と判断された固定、保存法を施行した26症例の細胞診標本を標本作製後経時的に免疫染色し、信頼性のあるER、PRの同定が可能な保存期間の長さについて検討した。同時に作製した凍結切片にもER、PRの免疫染色を施行した。

これらの症例のER、PRの有無については、同時に施行した新鮮凍結切片を用いた免疫染色所見や腫瘍組織抽出液を用いたEIA法による定量的測定結果



を参考にした。

〔免疫染色〕 保存された検体を PBS にて洗浄し、3% skimmed milk in PBS で室温にて15分以上blockingの後、一次抗体と反応させた。一次抗体は、ER に対してはGreeneらが開発した抗ERラットモノクローナル抗体(H222)<sup>22</sup>

(Abbott, Chicago, USA) を原液( $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ )にて、PRに対しては同じくGreeneらが開発した抗PRラットモノクローナル抗体(KD68)<sup>23,24</sup>

(Abbott) を原液( $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ )にて使用した。一次抗体との反応時間は、湿箱内にて $37^{\circ}\text{C}$ 、30分あるいは $4^{\circ}\text{C}$ 、overnight とした。また陰性コントロールは、一次抗体の代わりに PBS と反応させた。次いで、PBS にて洗浄後二次抗体と、また再洗浄後三次反応物としてstreptavidin と反応させた。二次抗体は、ビオチン化抗ラット IgG 抗体 (Vector, Burlingame, USA) を1: 200、あるいは biotinylated universal secondary antibody (LIPSHAW, Pittsburgh, USA) を1: 200にて使用し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、30分反応させた。三次反応物は、peroxydase - conjugated streptavidin (DAKO, Copenhagen, Denmark) を1: 600にて使用し、これも $37^{\circ}\text{C}$ 、30分反応させた。発色は、

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (SIGMA, Saint Louis, USA) 5mg, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10 \mu\text{l}$  をPBS 20mlに溶かしたものをうい、顕微鏡下に発色させた。水洗にて発色反応を停止し、5倍に希釈したGill's Hematoxylin (武藤) にて核染色し、通常の方法で脱水、透徹、封入した。細胞核が DAB にて褐色に染色された腫瘍細胞が全腫瘍細胞中で30%以上を占める症例をレセプター陽性と判定した。陰性コントロールと染色強度の差が明らかでない場合は全て陰性として扱った。

〔凍結切片標本の免疫染色〕 前述の切除された腫瘍組織より、細胞診標本を作製した断面に隣接する腫瘍組織片を切り取り、Tissue compound (Miles, Elkhart, USA) 内に包埋し、液体窒素中に投じて急速凍結した。Deep

freezer内に入れ、切片作製までの間  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。Cryostat (サクラ精機) にて厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片を作製し、0.02% poly-l-lysine を塗布したスライドガラス上に貼り付け、HE 染色用あるいは免疫染色用の標本とした。免疫染色用の検体はPFAまたはZamboni液にて $4^{\circ}\text{C}$ 、10分間固定した後、PBSにて洗浄し、さらに Methanol にて5分、Acetone にて3分間の固定を加えた。図1にあるblocking以下の免疫染色は、乾燥細胞診標本の場合と同様の方法で行った。細胞診標本における免疫染色の場合と同様に、30%以上の腫瘍細胞の核がDABにて染色された症例を陽性と判定した。

[ER、PRの定量測定] ER、PRともに市販のEIA用 Kit (Abbott) を使用し、添付された指示に従い、以下に示す手順にて定量測定した<sup>25</sup>(図3)。

1. 前述した切除された腫瘍組織より約1g程度の量の定量用検体を採取し、直ちに液体窒素内で急速凍結させた後、測定するまで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存する。

2. 検体を冷凍庫から出し、ホモジネート用緩衝液 [ 10mM Tris (pH7.5), 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.4M NaCl, 2mM dithiothreitol, 0.3mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.3mM leupeptin, 0.5% aprotinin ] <sup>26</sup>を加え、氷上で約5秒間×3回ホモジナイズする。

3. himac CS 120 (Hitachi)にRp 100AT-163のroterを使用し、50,000 rot./min. ( $103,000\times g$ )にて、 $4^{\circ}\text{C}$ 、60分間遠心分離する。

4. 上清 (supernatant)を分離し、BioRad社のKitを用いたBradford 法による蛋白定量<sup>27</sup>を施行した後、前述の緩衝液を加えて、1~2mg/ml程度の蛋白を含む定量用の検体液を作製する。

5. 抗ERあるいは、抗PRモノクローナル抗体を付着させたビーズと検体液を $4^{\circ}\text{C}$ 、 $18\pm 1$ 時間反応させる。

6. ビーズを純水にて洗浄した後、peroxydase 標識された他の種類のモノクローナル抗体と、ERは $37^{\circ}\text{C}$ 、60分間、PRは $4^{\circ}\text{C}$ 、60分間反応させる。

7. ビーズを純水にて洗浄した後、*o*-phenylenediamine dihydrochloride 3mg / mlを含む発色液と室温にて30分間反応させる。

8. 1N 硫酸にて反応を停止し、分光光度計 (U Best-30, JASCO) にて492nmの吸光度を測定する。

9. 既知量のERまたは PR を含む検体をもとに希釈系列を作り、同時に定量検査を施行し、この結果を標準とした検量線を作製し、これから検体のER、またはPR 量を計算する。検体液の蛋白濃度で補正し、腫瘍組織蛋白1mgあたりのER, PR 量を計算する。

#### [結果]

##### 1. 固定、保存のための条件決定

検索の対象とした26症例のうち表 2に示す13症例については、Carson 液、PFA、Zamboni 液による固定を施行し、免疫染色所見について比較した。強拡大下に DABによって染色された腫瘍細胞の核を観察すると、Carson液で固定した場合他の2種の固定液を使用した場合と較べて色素の粒子が粗く、染色がまばらであるように思われた。PFA、Zamboni液はいずれもより緻密で鮮明な染色所見がえられた。表 2にある3つの固定液の中ではZamboni 液を使用した標本が最も鮮明であった。図 4に実際の染色例を示す。一方表 3の8症例については Zamboni液と95% Ethanolによる固定を施し免疫染色所見を比較したが、Ethanol による固定を施行した標本においては DABによる核の染色が極めて不鮮明となることが明らかであった。Zamboni 液で固定された場合核全体がDABにより一様に染色されて容易に陽性と判定可能であった標本も、Ethanolで固定されると染色が極めて不鮮明となり陽性と判定することは困難となった。95% Ethanol による固定は乾燥細胞診標本を用いたER、PRの免疫染色のためには不適であると判断された(図5)。以上の結果から、

乾燥細胞診標本上のER、PRの免疫染色のための固定液としては Zamboni 液が最も適していると結論した。

次に、[症例と方法]にて述べた4通りの方法で固定、保存された11症例の乾燥細胞診標本について検体作製後1週、2週、4週、8週、12週後にER、PRの免疫染色を施行し、染色所見を比較した。

A法にて固定、保存された検体においては、8週間以上保存された標本においても陽性例のER、PRのDABによる染色強度(intensity)があまり下がらず、各標本について陽性の判定が容易かつ正確に可能であった。また細胞核、細胞膜等の形態の保存状態が最も良好であった(表4, ER; 表5, PR)。

B法にて固定、保存された検体においては、凍結切片でER、PR陽性と判定された症例からえられた細胞診標本が保存開始1週間後よりER、PRの染色強度が弱くなり始め、また細胞形態の破壊(核崩壊、細胞質の溶解等)も認められた。このため8週後にはERでは8症例中6症例において、PRでは8症例全例が同定不能となった。(表6, ER; 表7, PR)

C法にて作製した標本においては、検体作製1週間後に、ER、PR陽性の8症例全例において著しい細胞形態の破壊が認められ、ER、PRともに同定不能となった。今回比較した4つの方法の中では最も保存状態が悪かった(表8)。

D法を施行された標本においては、C法による固定、保存を施行された症例ほど著しくはないが、細胞形態の破壊が認められた。標本作製1週間後では、8症例中5症例に細胞質の膨張が認められ、そのうちの3症例においては判定が不可能となった。この傾向は、経時的に残りの症例においても認められるようになり、検体作製後8週間後においては、8症例中7症例において細胞形態の破壊により同定不能となった。(表9)

症例N.Y.より得られた乾燥細胞診標本にA法、B法、C法、D法の4法に



よる固定、保存を施行し、1週間後、8週間後にERの免疫染色した所見を図6-1~4に示す。

以上の結果から長期保存された乾燥細胞診標本を免疫染色してER、PRを同定するためには、検体採取後先ず固定することが重要であり、また今回使用した固定液の中ではZamboni液にて固定された検体が特に鮮明な免疫染色結果を示し、保存条件としては-20℃に冷やした検体保存液中で保存すれば良いことが明らかになった。

## 2. 多数症例の経時的解析

以上により固定、保存条件が決定できたので、この条件にて多数の乳癌症例から作製された乾燥細胞診標本における免疫染色所見の経時的解析を行った。表10に示す26症例につき(A法)により標本作製後1週、2週、4週、8週、症例によってはさらに12週、16週後まで保存した標本を経時的に免疫染色し、ER、PRの染色所見を検討した。

凍結切片における免疫染色にてER陽性と判定された19症例を検索したところ、それらの乾燥細胞診標本では1、2、4週後においては全症例が陽性と判定しえた。次第に染色強度は低下する傾向があるものの、8週間後においても17症例中16例が陽性と判定可能であった。12週間後では検討可能であった症例が少なかったが8症例中8例、16週間後では2症例中2例が陽性と判定可能であった(表11)。また凍結切片を用いた免疫染色にてER陰性と判定された7症例についても同時に乾燥細胞診標本における免疫染色所見を経時的に検討したが、全症例について検討しえた全ての標本について陰性と判定された(表12)。

PRについても全く同様の結果をえた。即ち凍結切片におけるPRの免疫染色にて陽性と判定された16症例について経時的に免疫染色の所見を検討をした

ところ、検体作製後 1週間後では16症例全例、2週間後では16症例中14症例、4週間後には15症例中15例、8週間後には14症例中13例が陽性と判定可能であった。検討しえた症例は少なかったが、12週間後は 7症例中 7例、16週間後は 2症例中 2例が陽性と判定可能であった(表13)。凍結切片における免疫染色でPR陰性と判定された10症例においても、ER 陰性の症例と同様に観察しえた全ての期間において全標本が陰性と判定された(表14)。

3. 乾燥捺印細胞診標本におけるER、PRの免疫細胞化学的判定結果と切除腫瘍よりえられた凍結切片標本におけるER、PRの免疫組織化学的判定結果およびEIA 定量値との比較

表 10の症例の内EIA法による定量値、凍結切片における免疫染色、A法による固定、保存を施行した乾燥細胞診標本の免疫染色の3種類の判定が可能であった23症例について、その結果間の一致率について検討した。ER については、EIA 法における陽性を5 fmol / mg prot.以上とすれば3つの判定結果は完全に一致する。PR については凍結切片と乾燥細胞診標本との間では完全に一致するが、EIA法で陰性(UD: undetectable)と判定されたが免疫染色では陽性と判定された症例が2例あった。

#### 4. 本法の臨床応用

##### a. 穿刺吸引細胞診検体におけるER、PRの同定<sup>28,29,30</sup>

表15に示す20 症例について、術前の穿刺吸引細胞診標本(FNA)をA法により固定、保存した後ER、PRの免疫染色を施行し、その判定結果を凍結切片における免疫染色の判定結果、EIA 法による定量値と比較した。表注に示したごとく凍結切片判定結果に対するFNAの sensitivity はER で92.3%、PR が90.0%、specificity はER、PRのいずれも100%であった。図7に陽



性例、陰性例のFNA、凍結切片における ERの免疫染色所見を示す。

症例M.O.においてのみFNA、凍結切片、EIA法における判定結果に著しい不一致が認められたが、他の19症例においてはよく一致していた。図8に症例M.O.の病理組織所見、新鮮凍結切片における免疫染色所見、穿刺吸引細胞診標本における免疫染色所見を示す。

#### b. 小腫瘍症例におけるER、PRの同定

表16に示す8症例はいずれも腫瘍径が小さく、定量検査用に充分な量の検体を得ることが困難であった。そこで7症例については腫瘍断面から乾燥捺印細胞診標本を作製し<sup>31</sup>、前述のA法に従って固定、保存をした上で免疫染色してER、PRの同定を試みた。また手術を拒否した1症例については、超音波ガイド下に穿刺吸引細胞診標本をえて、これを同様の方法にて免疫染色した。5症例がER(+), PR(+), 3症例がER(-), PR(-)と判定された。図9に、陽性症例(腫瘍径0.5×0.5 cm)のマクロ所見、捺印細胞診検体における免疫染色所見を示す。

#### c. 切除不能症例におけるER、PRの同定

表18に示す7症例はいずれも切除不能の進行乳癌、あるいは再発乳癌症例であり、ER、PR定量測定のための検体をえることは困難であった。しかし穿刺吸引細胞診標本をえることは容易であったため<sup>32</sup>、これを前述のA法に従って固定、保存した後免疫染色し、ER、PRを同定することが可能であった。表18に結果を示した通り2症例がER(+), 2症例がPR(+)と判定された。左鎖骨上リンパ節より得られた穿刺吸引細胞診検体を免疫染色することによりER(+), PR(+)と判定しえた症例6.の臨床所見、細胞診標本における免疫染色所見を図10-1に示す。本症例は多発性骨転移、及び著明な腋窩リンパ節

転移が原因すると思われる左上腕浮腫を呈しており、衰弱が著しく生検さえ困難な状態であったが、鎖骨上リンパ節転移より穿刺吸引法にて細胞診標本をえることが可能であった。本症例においては化学内分泌療法としMPA+UFTを投与したところ著効し、約8ヶ月後には図10-2に示すごとく臨床症状の改善が認められた。

#### [考察]

近年種々の抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体<sup>33</sup>が開発され、それを免疫染色の一次抗体として使用することにより、各種の腫瘍マーカー<sup>34,35</sup>や治療方針決定のため、あるいは予後を予想する上で参考となる種々の因子<sup>35,36,37</sup>を病理組織標本上にて直接確認することが可能となった。しかしこれらの抗体で認識される抗原のある種のもは常温にては不安定なため、信頼性のある染色所見をえるためには液体窒素等を用いて低温下にて新鮮な検体を急速凍結し、deep freezer内に保存し、専用の機器にて作製した薄切切片を材料として免疫染色する必要があると言われてきた<sup>39</sup>。しかし臨床の場においては、すべての施設に凍結、保存のための設備が完備されているとは限らず、また臨床医にとって凍結、保存の手間は決して無視できるものではない。そのためしばしばこれらの重要な情報をえることなく診断、治療を進めねばならないことがある。細胞診領域においては、標本採取後直ちに湿固定された細胞診標本が免疫染色の対象とされてきたが、より作製法が簡便な標本にて免疫染色を施行することが可能となれば、細胞診領域における免疫染色の適応が拡大するので臨床上の意義が大きいと考えられた。著者は凍結保存された検体より作製された切片標本と、腫瘍組織より採取され冷風乾燥された細胞診標本とでは抗原としての条件が似通っているのではないかと考え、従来あまり免疫染色の対象とはならなかった作製後長期保存された乾

乾燥細胞診標本を免疫染色に用いて乳癌細胞のER、PRを同定しようと試みた。乾燥細胞診標本はGiemsa染色用<sup>40</sup>の標本として広く用いられている。乾燥細胞診標本の作製は非常に簡単であり、少量の腫瘍組織からも捺印(imprint)、穿刺吸引(FNA)、擦過(touch)等の方法で多数の検体を作成することが可能である。

本研究において免疫染色の対象としたER、PRは、乳管上皮、子宮内膜細胞等の卵巣ホルモン標的臓器の細胞核内に存在する蛋白であり<sup>41,42</sup>、estrogen、progesteroneと特異的に結合することによりDNAからmessenger RNAへの転写を促進して内分泌的機能を発現する<sup>43</sup>。熱に不安定なため、常温では短時間に変性、失活することが知られている<sup>44</sup>。乳管上皮より発生する乳癌細胞においてもER、PRを有するものが50～60%程度あるといわれ、これらのreceptorを有する乳癌に対しては、内分泌療法の有効性がより高いことが知られている<sup>45</sup>。このため根治手術後の補助療法として、あるいは進行再発乳癌に対する集学的治療の一環としての内分泌療法の適応を決定するためには、腫瘍組織中のER、PR量を測定する必要がある。定量的測定法であるDCC法やEIA法による場合、定性的測定法である免疫染色法いずれの場合においても正確なER、PRの測定のためには新鮮な検体の-60℃以下の凍結、保存が不可欠であった。しかし先にも述べたように、多くの一般的な臨床施設においては凍結、保存のための設備が完備されておらず、標本の急速な凍結、長期的保存は困難である。また腫瘍径の小さな症例や切除不能症例においては測定のために必要な量の検体をえることができないので、従来の検査方法ではER、PRに関する情報をえることが不可能な場合がある。しかしこれらの場合でも、捺印細胞診標本や穿刺吸引細胞診標本なら作製可能である。細胞診標本に免疫染色を施行することにより、ER、PRを同定する試みに関してはこれまでもいくつか報告があるが<sup>46,47,48,49,50</sup>、いずれも標

本作製後直ちに免疫染色作業を開始したか、新鮮凍結標本と同様に  $-60 \sim -80^{\circ}\text{C}$  の低温下に保存した細胞診標本が用いられていた。実際の臨床の場においては、標本作製後免疫染色作業を開始するまでに時間的な余裕があることが望ましい。免疫染色作業の効率化、あるいは他の施設に外注する場合を想定すると標本作製後 2 週間以上経過しても免疫染色にて ER、PR の正確な同定が可能な方法の開発が必要であると思われた。

以上のことから、本研究を開始するにあたっては、臨床の場において作製が容易な乾燥細胞診標本を免疫染色用の標本として用い、一般に普及している冷蔵庫が許容する  $-20^{\circ}\text{C}$  程度の温度帯にて標本作製後 2 週間以上保存しても免疫染色による ER、PR の同定が可能な固定法、保存法を開発をめざした。また多くの施設にて普及が容易であるように固定、保存のために特殊な試薬や機材を使用することがないように工夫した。判定の基準については、内分泌療法の効果が期待できる ER、PR 陽性 ( $\geq 5 \sim 10 \text{ fmol} / \text{mg prot.}$ ) の乳癌症例のみをスクリーニング可能であれば臨床的には十分有用であることから、ごく単純なものとした。免疫染色の二次、三次反応については、最も感度が優れており染色所見が鮮明であると著者が考えている LSAB 法を用いた<sup>51,52</sup>。本染色法は操作が簡単であり、多くの kit が市販されていて容易に入手可能である。

研究開始当初は未固定の標本を  $-10 \sim -20^{\circ}\text{C}$  の温度帯にて冷蔵保存してから、免疫染色直前に固定する方法を試みたが成功しなかった。これは後の固定、保存条件を比較した実験にても明らかのように、長期保存された乾燥細胞診標本を用いて ER、PR を同定するためには、乾燥細胞診検体を作製したらまず固定をすることが重要だったからである。未固定の乾燥細胞診標本を長期保存する試みは Charpin らによって報告されているが、彼女らは  $-60^{\circ}\text{C}$  以下の低温下に冷蔵することにより良い結果をえている<sup>48</sup>。しかし著者の経験



では乾燥細胞診標本を室温に戻す際には標本細胞に空気中の水分が凝結し、細胞の形態を損ねる危険があり、このような低温下で未固定の乾燥細胞診標本を保存することは免疫染色を施行する上で不適当と考えている。

以上の結果から、未固定の乾燥細胞診標本を最初に設定した条件にて長期保存することはER、PRの免疫染色を施行する上で不適当であり、適切な固定を施行した後に検体を冷蔵保存すべきであると考えられた。

まずER、PRの免疫染色の固定用として最適な固定液について検討した。

本研究にて検討の対象とした3種の固定液は、いずれも電子顕微鏡観察用の検体を固定するために考案されたものである。まずPFAは、Ki-67等の核内蛋白用の固定液として広く使用されており<sup>20</sup>、本固定液にて固定された検体は、細胞核、細胞膜などの形態がよく保たれている。筆者はしばしばPFA固定した新鮮凍結切片にてER、PRの免疫染色を行い、良好な結果を得ている。調整は比較的簡単であるが、長期保存が不可能で調整後約2週間以内に使用せねばならないのが難点である。Zamboni液は飽和ピクリン酸液にParaformaldehydeを溶解し、リン酸緩衝液にて希釈して調製したものである。本固定液はヒトの精子を固定し、電子顕微鏡用の標本作製するために考案された<sup>18</sup>。細胞小器官の形態がよく保存されとの報告がある。本固定液で固定された検体においてもPFAで固定した場合と同様に細胞形態が良好に保存される。新鮮凍結切片におけるER、PRの免疫染色に使用したところ、良好な結果が得られたとの報告もある<sup>5,4</sup>。本固定液の最大の利点は、調整がやや複雑ではあるが、調整後室温にて長期間（6カ月以上）安定な点である。この長期安定性は、臨床の場においては大いに有用である。著者の経験では、核内蛋白だけでなく、リンパ球表面マーカーや、CEA、c-erbB2等の膜抗原の免疫染色にも適しており、汎用性に富む<sup>25</sup>。三番目のCarson液は緩衝ホルマリン固定液の一種であり、ラット腎糸球体を固定し電子顕微鏡にて観察する

ために考案された<sup>21</sup>。抗ER、PRモノクローナル抗体の開発にあたったGreeneらは3.7% Formaldehyde in phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS)を使用している。一方Carson液にて固定した方が染色結果がより良好であるとの報告もあることから<sup>50</sup>、本研究においてはこれらの3種の固定液について検討した(図2)。その結果3種の固定液を使用した標本の染色所見の間に大きな差はなかったが、Carson液にて固定した標本は他の2種の固定液にて固定した検体に比べてER、PRの染色強度(intensity)はほぼ同様であるが、核を染めるDABの色素粒が粗雑になり鮮明さを欠く傾向があった。また残りの2種のうちではZamboni液で固定した検体のほうがPFAで固定したものより鮮明であり、より良好な染色結果が得られた。

湿固定用の固定液として最も広く使用されている95% Ethanolは、これらの3種の固定液と比較すると格段に染色結果が劣り、染色を試みた全症例においてER、PRともに陽性所見がwash outされたように弱いものとなった。95% Ethanolは従来よりER、PRの固定液としては不適であるとの報告があるが<sup>54</sup>、それらを裏付ける結果となった。以上の結果から固定液としてはPFAかZamboni液を使用すべきであり、臨床場においては調製後長期間安定なZamboni液がより有用であると結論した<sup>57</sup>。

固定後の検体を長期間 -20℃にて保存するためには、Crawfordらが考案した検体保存液<sup>19</sup>を使用した。この検体保存液にはGlycerolが50%、Sucroseが0.25mol/lと高濃度に含まれているが、これらの添加物は凍結融解に際して蛋白質の変性を防止する働きがある<sup>58</sup>。これらの物質は溶液中においては正常の蛋白質表面から排除されるような性質があり、排除される程度は蛋白質の表面積に比例する。蛋白質の表面積の変化は蛋白質の立体構造の変化によって生じる。蛋白質の立体構造は分子内部の配位に基づき、これが変化することは即ち変性を意味する<sup>59</sup>。熱力学的平衡関係においてこれらの添加物



は蛋白質の立体構造を保つように働き、安定化作用を持つという<sup>60,61</sup>。またこれらの添加物は氷点下の温度帯において、溶液内の水分が氷結することによって起きる浸透圧やpH等の溶液性状 (solution properties) の急激な変動を緩和し、このことも凍結に伴う蛋白質の変性を防止することに寄与する<sup>61</sup>。検体保存液は、考案された当初は切除された未固定の組織を -20℃ にて保存する際に使用されてきた。本液を用いると、保存後約 2カ月の間 ER、PR の活性低下が本保存液を使用しない場合と比較してかなり軽度であると報告された<sup>19</sup>。次いで本保存液は、固定された凍結切片標本を本温度帯にて長期保存するために用いられた<sup>54,62</sup>。しかし凍結切片を作製後固定まで終えてから免疫染色を開始せずに長期保存することはあまりありえず、Tissue compound に包埋した新鮮凍結標本の保存性が優れているので、さほど有用であったとはいえない。筆者は乾燥細胞診標本を固定した後この検体保存液内に浸けて本温度帯にて保存すれば長期の保存が可能となるのではないかと考え、試用したところ結果は以上述べてきたように非常に良好であった。しかし固定せずに検体保存液の中に浸けて本温度帯にて保存された検体は、PBS内に浸けて 4℃ にて保存した場合ほど著しくはないが、経時的観察によると細胞形態の崩壊が原因と思われる染色所見の悪化を来した。そこで長期保存された乾燥細胞診標本を用いて ER、PR を免疫染色にて同定するためには標本作製後まず Paraformaldehyde 系の固定液で固定することが最重要であり、次いで検体保存液の中に浸けて -20℃ にて保存することであると結論した。

これまでの研究結果および臨床の場での簡便性を考慮に入れて、長期間保存された乾燥細胞診標本を用いて、免疫染色にて ER、PR を同定するための検体作製手順を決定した (図1)。この方法によると、臨床医は乾燥細胞診標本を採取、固定した後、PBSで洗浄して検体固定液に浸ける操作までを担

当すればよい。この作業に要する時間は約15分である。もし多忙な場合は、乾燥細胞診標本を細胞診担当技師に委ね、以後の固定、保存作業を依頼してもよい。免疫染色を施行できない施設においては、検体保存液に浸けた状態で、他の施設まで運搬すればよい。 $-20^{\circ}\text{C}$ の温度は宅配使用冷蔵庫でも許容可能な温度であり、今回の検索結果によれば本温度帯にて2カ月以上検体を保存可能であるので、日本各地の施設間にて検体を授受する時間的余裕が十分にある。

以上のような研究結果から最良とされた固定法、保存法によって保存された乳癌26症例の乾燥細胞診標本につき、経時的に施行したER、PRの免疫染色所見を、新鮮凍結切片における免疫染色所見、EIA法による定量測定値と比較した。免疫染色の判定基準は、筆者の経験により全腫瘍細胞中に陽性細胞を30%以上有する症例を陽性として扱ったが、3つの結果はよく一致した。特に凍結切片における免疫染色所見と、乾燥細胞診標本における免疫染色所見とはほぼ完全な一致が認められた<sup>63,64</sup>。保存開始後8週間は本研究により考案された固定、保存をされた細胞診検体におけるER、PRの免疫染色所見は信頼性があると結論した。

腫瘍組織内のER、PRの分布には不均一性があることが知られている<sup>53,54,65</sup>。EIA法ではこの問題に対応できずに、実際には一部の腫瘍細胞がER、PRを多く含有していても測定結果は腫瘍組織全体で平均化されてしまい、false negativeと判定する危険性がある。一方免疫染色法では腫瘍組織内のER、PRの分布を視覚的に把握することができfalse negativeを回避できる。また腫瘍細胞が間質に比べて少ない乳癌では、定量測定ではER、PR量が間質を含む全腫瘍組織で平均化されてしまうのでやはりfalse negativeとなりがちであり、これらの理由からEIA測定値よりも凍結切片におけるER、PRの免疫染色所見のほうが腫瘍組織のER、PRの実状をより反映しているとの報告

がある<sup>54,63,66</sup>。今回の検索でも、PRについてはEIA法では陰性と判定されたのに、凍結切片では陽性と判定された症例が2例認められた。逆に免疫染色では陰性と判定されたのにEIAで陽性と判定された症例はなく、非特異染色の場合を除けば免疫染色ではfalse positiveの結果はえられ難いものと思われる。本研究にて開発された方法により長期間保存された乾燥細胞診標本におけるER、PRの免疫染色所見は凍結切片の染色所見とはほぼ完全に一致するので、信頼性が高いといえる。経時的な検索の結果、固定後8週間は信頼性を維持することが可能であることが確認された。ちなみに今回の検索は基本的には8週間の保存の可否を中心に調べた。より多くの細胞診検体を作製し、長期間にわたって経時的に免疫染色を施行すれば、より長期間保存後の信頼性に関する知見を得ることができただろうと思われる。しかし本研究の目的は、臨床に必要と思われる検体作製後2週間以上免疫染色によるER、PRの同定が可能な固定法、保存法の考案であり、その目的は十分に満足されたと考えられるのでこれ以上長期にわたる検討は行わなかった。

最後に、本研究にて考案された乾燥細胞診標本の固定、保存法を臨床応用し、実用性に関して検討を加えた。

まず穿刺吸引細胞診(FNA)によって得られた乾燥細胞診標本を固定、保存し、免疫細胞化学的にER、PRを同定したところ、切除標本よりえられた新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学的同定結果とよく一致した。新鮮凍結切片においては陽性と判定されながら、細胞診標本における免疫染色では陰性と判定された症例M.O.は図8に示したように腫瘍組織中のER、PRの分布が均一ではなく、また腫瘍組織内に著しく間質の発達した組織型であったために、穿刺吸引にて採取された部位の腫瘍細胞にはER、PRが少なかったものと考えられた。盲目的に腫瘍組織の一部のみを採取する穿刺吸引細胞診標本では、このようなsampling errorによるfalse negativeが生ずる危険があることに注

意せねばならない。しかし切除前にER、PRの多寡を推定できる信頼性は十分にあり、切除手術を行わない乳癌治療を施行する場合には、ER、PRの評価方法として役立つと思われた。

腫瘍が小さい乳癌症例においては、切除標本はまず病理組織診断のために十分な量を提出するべきであるが、そのためにER、PRの定量、あるいは新鮮凍結標本に必要な量の検体がえられないことがある。このような場合にも、腫瘍断面から多数の捺印細胞診標本をえることは可能であるので、この細胞診標本を固定、保存後免疫染色すればER、PRの同定が可能である。著者は、8例の腫瘍径の小さな乳癌症例に対して細胞診標本によるER、PRの免疫細胞化学的同定を試みたところ、いずれの症例においても同定は容易であった。今回判定を試みた症例の中では、最小の腫瘍径は0.5cmであったが、この症例においても多数の細胞診標本を作製することが可能であった。今後は小腫瘍症例に関しては、腫瘍断面よりえられた乾燥細胞診標本を用いた免疫細胞化学的方法によってER、PRを同定し、内分泌療法の適応を決定するべきであると判断された。

進行、再発乳癌症例では、ER、PRの定量測定、あるいは新鮮凍結標本作製のための腫瘍組織をえることが困難な場合がある。現在このような症例においてはER、PRに関する正確な情報をえることは困難である。しかし体表より露出した腫瘍を擦過、あるいは穿刺吸引することにより細胞診標本をえることが可能である。このようにして得られた細胞診検体を、本研究により考案された固定、保存を施行した後免疫染色することにより、定性的ではあるがER、PRの有無を判定することが可能となる。筆者は7例の進行、再発乳癌症例に対し穿刺吸引細胞診(FNA)にて乾燥細胞診標本を作製し、固定、保存後免疫染色にてER、PRの有無を判定を試みた結果、2例がER(+), 1例がPR(+)と判定可能であった。うちPR(+)であった1例においてはMPAによる



内分泌療法が有効であった。ER、PR の多寡が抗ホルモン療法の有効率と直結するとはいえないが、切除不能症例における内分泌療法の適応を決定する上で有用な検査法であることが確認された<sup>45</sup>。

これらの臨床応用によりえられた結果から、本研究により考案された、長期保存された乾燥細胞診標本を用いた免疫細胞化学的なER、PR同定法は臨床的実用性があり、穿刺吸引細胞診標本、小腫瘍症例よりえられた捺印細胞診標本、切除不能症例よりえられた細胞診標本等を材料として、免疫細胞化学的にER、PR を同定するための手段として有用であると結論した。

#### [結論]

乳癌組織よりえられた細胞診検体を冷風乾燥し、Paraformaldehyde系固定液(特にZamboni液)で固定し、PBS、Glycerol等量混合液からなる検体保存液中に浸け、通常型の冷蔵庫の冷凍温度である -20℃にて保存すると、検体作製後 8週間以上経過しても、免疫細胞化学的にER、PR の同定を行うことが可能である。本方法によるER、PR の同定結果は従来の EIA法による定量測定結果や新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学的同定結果とよく一致し、信頼性が高いと考えられる。また本方法を臨床応用すれば、①腫瘍穿刺吸引細胞診標本を用いた手術前の時点におけるER、PR の免疫細胞化学的同定、②従来の定量あるいは定性的測定法に用いるための検体をえることが困難であった小腫瘍乳癌症例のER、PR の免疫細胞化学的同定、③切除不能症例からでも採取可能な細胞診標本を用いたER、PR の免疫細胞化学的同定がいずれも可能である。



本方法は手技的に容易で特殊な機器を要さず、多くの一般的な外来診療施設における ER、PRの同定を可能とする。また従来の方法では測定困難であった症例におけるER、PRの同定を容易に可能とし、内分泌療法法の適応を合理的に決定するために役立つと考えられる。

[参考文献]

1. Beaston GH. On the treatment of inoperable cases of the mamma. *Lancet* 1896; 2: 104-165.
2. Huggins C, Bergenstal DM. Inhibition of human mammary and prostatic cancer by adrenalectomy. *Cancer* 1952; 12: 134-141.
3. Fracchia AA, Farrow JH, Miller TR, Tollefsen RH, Greenberg EJ, Knapper WH. Hypophysectomy as compared to adrenalectomy for advanced breast cancer. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 133: 241-246.
4. 吉田稔. Tamoxifen. 乳癌の臨床 1986; 1(2): 191-199.
5. 飯野佑一、泉雄勝. Medroxyprogesterone Acetate. 乳癌の臨床 1986; 1(2): 201-213.
6. Baum M, Brinkley DM, Rubens RD, Dossett JA, McPherson K, Patterson JS, Smiddy FG, Stoll BA, Willson A, Richards D, Ellis SH. Controlled trial of Tamoxifen as a single agent in management of early breast cancer. *Lancet* 1985; 1(8433): 836-840.
7. Cole MP, Jones CTA, Todd IDH. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer---an early clinical appraisal of ICI 46, 474. *Br J Cancer* 1971; 25: 270-275.
8. Pannuti F, Martoni A, Lenaz GR, Piana E, Nanni P. A possible new approach to the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 499-504.
9. Jensen EV, DeSombre ER, Jungblut PW. Estrogen receptors in hormon-responsive tissues and tumors. In: Wissler RW, Dao TL, Wood Jr S eds. *Endogenous Factors Influencing Host-tumor Balance*. Chicago: Univ Chicago Press, 1967: 15-30.
10. McGuire WL. Hormon receptors, their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Semin Oncol* 1978; 5: 428-433.
11. 飛岡紀彦. デキストランチャコール吸着法による人乳癌エストロゲン受容体に関する研究. 名市大医誌 1976; 26: 487-498.
12. 大浪俊平、仲山親、大浪澄子、膳所富士男、江藤澄哉. モノクローナル抗体を用いた Enzymeimmunoassay および Radioimmunoassay による乳癌組織中エストロゲンリセプターの測定. 癌と化学療法 1986; 13(12): 3447-3452.
13. Soendergaard G, Pedersen KO, Paulsen SM. Estrogen Receptor Analysis in Breast Cancer: Comparison of Monoclonal Immunohistochemical and Biochemical Methods. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25(10): 1425-1429.
14. Berger U, Wilson P, Thethi S, McClelland RA, Green JL, Coombes RC. Comparison of Immunocytochemical Assay for Progesterone Receptor with a Biochemical Method of Measurement and

- immunocytochemical Examination of the Relationship between Progesterone and Estrogen Receptors. *Cancer Res* 1989; 49:5176-5179.
15. 田中昇. 細胞診の欠点・弱点および長所: 田中昇編, 細胞診教本—その基礎と実際—. 東京: 克誠堂, 1985: 57-58.
16. Osborn M, Domagala W. Immunocytochemistry. In: Bibbo M eds. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia: WB Saunders, 1991: 1011-1051.
17. 青木殉、佐々木なおみ、日野理彦、難波紘二. 血液塗抹標本のアルカリホスファターゼ (ALP) 標識免疫染色法における至適固定法及び未染標本保存法の研究. *臨床血液* 1991; 32(1): 11-18.
18. Stefanini M, DeMartino C, Zamboni L. Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy. *Nature* 1967; 216(Oct 14): 173-174.
19. Crawford D, Cowan S, Hyder S, Macmenamin M, Smith D, Leake R. New Storage Procedure for Human Tumor Biopsies prior to Estrogen Receptor Measurement. *Cancer Res* 1984; 44(Jun): 2348-2351.
20. Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin Fixation for the Electron Microscopy: A Re-evaluation. *Am J Clin Path* 1973; 59: 365-373.
21. 小針喜美子、森下保幸、森茂郎. 免疫組織学的核内蛋白の同定法. 検査と技術 1991; 19(2):1030-1033.
22. Greene JL, Nolan C, Engler JP, Jensen EV. Monoclonal antibody to human estrogen receptor. *Biochem* 1980; 77(9): 5115-5119.
23. Press MF, Udove JA, Greene JL. Progesterone Receptor Distribution in the Human Endometrium. *Am J Path* 1988; 131(1): 112-124.
24. Bevilacqua P, Pea M, Gasparini G. Immunocytochemical Detection of Progesterone Receptor by Monoclonal KD-68 Antibody in Operable Breast Cancer: Correlation with Biochemical Assay, Pathological Features and Cell Proliferative Rate. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25(11): 1595-1602.
25. Greene JL, Jensen EV. Monoclonal Antibodies as Probes for Estrogen Receptor Detection and Characterization. *J Steroid Biochem* 1982; 16: 353-359.
26. Jiang SY, Jordan VC. Growth Regulation of Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells Transfected with Complementary DNAs for Estrogen Receptor. *J Nat Cancer Inst* 1992; 84(8): 580-591.
27. Bradford M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
28. Coomes RC, Powles TJ, Berger U, Wilson P, McClelland RA, Gazet JC, Trott P, Ford HT. Prediction of

- endocrine response in breast cancer by immunocytochemical detection of estrogen receptor fine needle aspirates. *Lancet* 1987; Sept 26: 701-703.
29. 森俊明、森本忠興、駒本幹正、小西康備、大嶺裕賢、門田康正. 乳癌における穿刺吸引細胞診によるエストロゲンリセプター(ER)の評価—特に転移リンパ節への応用について—. *日臨外会誌* 1990; 51(8): 1638-1642.
30. 内田賢、篠崎登、中野聡子、長原修司、山下見徳、武山浩、南雲吉則、桜井健司. 穿刺吸引細胞診による乳癌エストロゲンレセプターの測定に関する研究. *日臨外会誌* 1991; 52(12): 2790-2793.
31. 伊藤仁、篠田玲子、赤塚由子、覚道健一、長村善之、徳田裕、久保田光博、田島知郎. 乳癌における細胞標本を用いた Estrogen Receptor(ER) の免疫細胞化学的研究. *日臨細胞会誌* 1989; 28(6): 824-829.
32. 小中千守. 穿刺吸引法: 海老原善郎、加藤治文編. 乳癌の細胞診—臨床と形態—. 東京: 金原出版, 1990: 31-35.
33. 岩崎辰夫. 単クローン抗体: 岩崎辰夫、安東民衛、市川かおる、保井孝太郎編. 単クローン抗体、ハイブリドーマとELISA. 東京: 講談社, 1983: 1-9.
34. 畑田率達、森武貞、中尾照逸、松浦成昭、工藤隆、神崎五郎. Monoclonal抗体による CEAの免疫組織学的研究—とくに正常組織について. *最新医学* 1983; 38(2): 401-405.
35. Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, Hageman P, Calafat J, Sonnenberg A, Van der Valk M. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer* 1984; 34: 197-206.
36. Wintzer H, Zipfel I, Schulte-Moenting J, Schulte-Moenting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67: 421-428.
37. Mori S, Mori Y, Mukaiyama T, Yamada Y, Sonobe Y, Matsusita H, Sakamoto G, Akiyama T, Ogawa M, Shiraisi M, Toyoshima K, Yamamoto T. In vitro and in vivo Release of soluble erb-B2 Protein from Human Carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 489-494.
38. Davidoff AM, Herndon II, Glover NS, Kerns BM, Pence JC, Iglehart JD, Marks JR. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991; 110(2): 259-264.
39. 名倉宏. 酵素抗体法(I)—光顕編—: 日本病理学会編、病理組織化学とその技術 (病理技術マニュアル4). 東京: 医歯薬出版, 1986: 201-233.
40. 坂本稔彦. 細胞診で用いられる主な染色法: 坂本稔彦編、臨床細胞診断アトラス. 東京: 文光堂, 1993: 290-298.

41. King WJ, Greene JL. Monoclonal antibodies localize estrogen receptors in the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307: 745-747.
42. Isola JJ, Helle MJ, Helin HJ. Immunocytochemical Detection of Progesterone Receptors in Breast Carcinoma. *Amer J Clin Path* 1990; 93(3): 378-382.
43. 川上正澄. 卵巣ホルモンの作用機序; 岡田直幹、内園耕二編、新生理学. 東京: 医学書院, 1975: 759-760.
44. 野村擁夫. 癌のレセプター; 乳癌のステロイドホルモンレセプター. *Jpn J Clin Path* 1990; 36: 26-30.
45. Oster MW. Endocrine Therapy and Chemotherapy for Breast Carcinoma. In: Haagensen CD, eds. *Diseases of the Breast*, 3rd ed.. Philadelphia: WB Saunders, 1986: 991-994.
46. Keshgegian AA, Inverso K, Kline TS. Determination of Estrogen Receptor by Monoclonal Antireceptor Antibody in Aspiration Biopsy Cytology from Breast Carcinoma. *Amer J Clin Path* 1987; 89(1): 24-29.
47. Lundy J, Lozowski M, Sadri D, Mishriki Y. The Use of Fine-Needle Aspirates of Breast Cancers to Evaluate Hormon-Receptor Status. *Arch Surg* 1990; 125: 174-176.
48. Charpin C, Andrac L, Habib M, Vacheret H, Xerri L, Devicor V, Lavaud MN, Toga M. Immunostain in Fine-Needle Aspirates and Multiparametric (SAMBA) Image Analysis. *Cancer* 1989; 63: 863-872.
49. Moriya T, Manabe T, Tsukayama C, Yamashita K, Ipponsugi S, Sonoo H, Senoo T. Imprint Immunocytochemistry of Estrogen Receptors in Breast Carcinoma. *Jap J Clin Oncol* 1990; 20(2): 159-163.
50. Katz RL, Patel S, Sneige N, Fritsche Jr HA, Hortobagyi GN, Ames FC, Brooks T, Ordonez NG. Comparison of immunocytochemical and biochemical assays for estrogen receptor in fine needle aspirates and histologic sections from breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15: 191-203.
51. Jules M Elias P, Margiotta M, Gabore D. Sensitivity and Detection Efficiency of the Peroxidase Antiperoxidase(PAP), Avidin-biotin Peroxidase Complex(ABC), Peroxidase-labeled Avidin-Biotin(LAB) Methods. *Amer J Clin Path* 1989; 92: 62-67.
52. Milde P, Merke J, Ritz E, Haussler MR, Rauterberg EW. Immunohistochemical Detection of 1,25-DihydroxyvitaminD<sub>3</sub> Receptors and Estrogen Receptors by Monoclonal Antibodies: Comparison of four Immunoperoxidase Methods. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(11): 1609-1617.
53. Ozzello L, DeRosa C, Habif DV, Greene GL. An Immunohistochemical Evaluation of Progesterone Receptor Status in Frozen Sections, Paraffin Sections, and Cytologic Imprints of Breast Carcinomas.



- Cancer 1991; 67 : 455-462.
54. King WJ, DeSombre ER, Jensen EV, Greene GL. Comparison of Immunocytochemical and Steroid-Binding Assays for Estrogen Receptor in Human Breast Tumors. *Cancer Res* 1985; 45: 293-304.
55. 馬場紀行、川端英孝、小池道子、上野貴史、杉谷巖、山崎善弥、出月康夫、森茂郎. 乳癌細胞診標本による免疫染色のための検体固定法、保存法の考案. *乳癌の臨床* 1994; 9(1): 48-49.
56. Paterson DA, Reid CP, Anderson TJ, Hawkins RA. Assessment of oestrogen receptor content of breast carcinoma by immunohistochemical techniques on fixed and frozen tissue and by biochemical ligand binding assay. *J Clin Path* 1990; 43: 46-51.
57. DeRosa CM, Ozzello L, Habib DV, Konrath JG, Greene JL. Immunohistochemical Assessment of Estrogen and Progesterone Receptor in Stored Imprints and Cryostat sections of Breast Carcinomas. *Ann Surg* 1989; 210(2): 224-228.
58. 荒川力. 凍結操作において添加物はどのようにした蛋白質を安定化するのか. *蛋白質・核酸・酵素* 1992; 37(9): 1517-1523.
59. Scheraga HA. 変性: タンパク質の構造 (小滝洋訳). *モダンバイオロジシリーズ 8*. 東京、共立出版, 1968; 83-130.
60. Lee JC, Gekko K, Timasheff SN. Measurements of Preferential Solvent Interactions by Densimetric Techniques. *Methods in Enzymology* 1979; 61: 26-49.
61. Carpenter JF, Crowe JH. The Mechanism of Cryoprotection of Proteins by Solutes. *Cryobiology* 1988; 25: 244-255.
62. Veronesi SM, Gambacorta M. Detection of Ki-67 Proliferation Rate in Breast Cancer. *Amer J Clin Path* 1991; 95: 30-34.
63. Fujino N, Sakamoto K, Shigaki N, Yamashita J, Kimura M, Akagi M. Analysis of estrogen Receptors in human Breast Cancer by Assays Using Monoclonal antibodies and by the Dextran-coated Charcoal Method. *Jpn J Surg* 1987; 17(5) : 369-376.
64. Holmes FA, Fritsche HA, Loewy JW, Geitner AM, Sutton RC, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Measurement of Estrogen and Progesterone Receptors in Human Breast Tumors: Enzyme Immunoassay Versus Binding Assay. *J Clin Oncol* 1990; 8(6): 1025-1035.
65. Seymour L, Meyer K, Esser J, MacPhail AP, Behr A, Bezwoda WR. Estimation of PR and ER by Immunocytochemistry in Breast Cancer. *Amer J Clin Path* 1990; 94: 535-540.

66. 小林俊三、佐本常男、岩瀬弘敬、柄松章司、伊藤由香里、正岡昭, モノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学キット(ERICA)によるヒト乳癌組織内エストロゲンレセプターの測定. 内分泌外科 1986; 3(2): 217-321.

表1. 固定法、保存条件の比較

A法	固定	⇒	検体保存液内で -20℃にて保存
B法	固定	⇒	PBS内で 4℃にて保存
C法	PBS内で 4℃にて保存	⇒	固定
D法	検体保存液内で -20℃にて保存	⇒	固定

ER、PRの抗原活性を維持するための固定、保存の至適条件を決定するために、各保存液について上記の4つの異なった方法で検体を固定、保存して経時的に免疫染色を施行し、染色所見を比較した。

表 2. 固定液によるER, PRの染色所見の比較 (I)

症例	Carson	PFA	Zamboni
S.K.	○	○	nd
Y.I.	△	○	nd
M.O.	△	○	nd
M.K.	○	○	nd
K.O.	○	○	nd
M.T.	○	○	◎
R.A.	△	×	◎
A.S.	○	○	○
C.S	○	○	◎
H.K.	○	○	○
Y.S.	○	○	◎
Y.A.	○	○	◎
S.K.	○	○	◎

◎: 極めて 鮮明    ○: 鮮明    △: 不鮮明    ×: 不良

nd: 施行せず

3種類のParaformaldehyde系固定液を用いて固定した乾燥細胞診標本においてER、PRの免疫染色を施行したところ、Zamboni液による固定を施行した標本における免疫染色所見が最も良好であった。

表 3. 固定液によるER, PRの染色所見の比較 (II)

症例	Zamboni	95% Ethanol
K.U.	◎	△
E.A.	◎	×
S.O.	◎	×
T.O.	◎	△
M.S.	◎	○
A.I.	◎	○
S.T.	◎	×
Y.A.	◎	×

◎: 極めて鮮明      ○: 鮮明  
△: 不鮮明          ×: 不良

Paraformaldehyde系の固定液と比較すると、95% Ethanol 固定した乾燥細胞診標本においてはER、PRの免疫染色所見は極端に不鮮明となり、95% Ethanol 固定はER、PRの免疫染色には適さないと考えられた。



表 4. 固定法保存法の相違によるER免疫染色所見の経時的推移の比較(A法)

1. ER陽性症例

症例	ER (fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w	12w
S.K.	16.0	+	+	+	+	
H.O.	9.6	+	+	+	+	+
Y.H.	nd	+	+	+	+	+
N.Y.	22.5	+	+	+	+	+
A.A.	nd	+	+	+	-	+
Y.Y.	57.2	+	+	+	+	+
Y.S.	31.7	+	+	+	+	+
E.A.	58.0	+	+	+	+	
まとめ	判定可能例/全例	8/8	8/8	8/8	7/8	6/6

(+): 30%以上の腫瘍細胞核が陽性を呈したものの。

未施行

nd: EIA施行せず。凍結切片における免疫染色にてER陽性と判定す。

2. ER陰性症例

症例	ER (fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w
M.F.	UD	-	-	-	-
N.I.	UD	-	-	-	-
K.K.	UD	-	-	-	-

UD: 測定感度以下

ER陽性、陰性の判定は新鮮凍結切片における免疫染色所見を優先した。ER陽性と判定された乳癌症例よりえられた乾燥細胞診標本を、先ず固定を行ってから検体保存液内に浸けて、-20℃にて保存した場合細胞標本の形態の保存が最も良好であり、また免疫染色における陽性所見の強度の低下が軽度であった。8週間以上保存した標本にても免疫染色による正確な同定が可能であった。ER陰性の標本が保存期間により陽性と誤判定されることはなかった。

表5. 固定、保存法の相違によるPR免疫染色所見の経時的推移の比較(A法)

1. PR陽性症例

症例	PR (fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w	12w
S.K.	252.0	+	+	+	+	
H.O.	38.5	+	+	+	+	+
Y.H.	nd	+	+	+	+	+
N.Y.	169.3	+	+	+	+	+
A.A.	nd	+	+	+	—	+
Y.Y.	UD	+	+	+	+	+
Y.S.	78.5	+	—	+	+	+
E.A.	151.4	+	+	+	+	
まとめ	判定可能例／全例	8 / 8	7 / 8	8 / 8	7 / 8	6 / 6

(+): 30%以上の腫瘍細胞核が陽性を呈したものの。

 未施行

nd: EIA施行せず。凍結切片における免疫染色にてPR陽性と判定す。

UD: 測定感度以下。

2. PR陰性症例

症例	PR (fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w
M.F.	UD	—	—	—	—
N.I.	UD	—	—	—	—
K.K.	UD	—	—	—	—

新鮮凍結切片における免疫染色上の判定結果をもとに、A法に従って固定、保存した乾燥細胞診標本についてPRに対して検討したところ、ERと全く同様の結果がえられた。本法により固定、保存された乾燥細胞診標本においては8週間以上保存された場合においても免疫染色による正確なPRの同定が可能と考えられた。

表 6. 固定、保存法の相違による ER 免疫染色所見の経時的推移の比較 (B 法)

1. ER 陽性症例

症例	ER (fmol/mgprot.)	1w	2w	4w	8w	12w
S.K.	16.0	—	—	判定不能	判定不能	
H.O.	9.6	—	—	—	—	—
Y.H.	nd	+	判定不能	判定不能	判定不能	判定不能
N.Y.	22.5	—	+	判定不能	判定不能	判定不能
A.A.	nd	+	判定不能	—	—	
Y.Y.	57.2	判定不能	判定不能	+	+	—
Y.S.	31.7	—	判定不能	判定不能	判定不能	—
E.A.	58.0	+	+	—	+	
まとめ	判定可能例/全例	3/8	2/8	1/8	2/8	0/6

 未施行

2. ER 陰性症例

症例	ER (fmol/mg prot.)	1w	2w	4w	8w	12w
M.F.	UD	—	—	判定不能	—	—
N.I.	UD	—	—	—	判定不能	判定不能
K.K.	UD	—	—	判定不能	—	—

乾燥細胞診標本を固定した後に PBS に浸けて 4℃ で保存した場合には、わずか 1 週間後から免疫染色上の陽性所見が弱くなり正確な ER の同定が困難となる。2 週間後から核、細胞質の形態が崩壊し判定不能となる症例が多くなった。B 法に従って固定、保存された乾燥細胞診標本においては長期間の保存後の正確な ER の同定は困難である。

表7. 固定、保存法の相違によるPR免疫染色所見の経時的推移の比較(B法)

1. PR陽性症例

症例	PR (fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w
S.K.	252.0	+	—	判定不能	判定不能
H.O.	38.5	判定不能	判定不能	+	判定不能
Y.H.	nd	+	判定不能	判定不能	判定不能
N.Y.	169.3	+	+	判定不能	判定不能
A.A.	nd	+	—	—	—
Y.Y.	UD	—	判定不能	判定不能	判定不能
Y.S.	78.5	—	判定不能	判定不能	判定不能
E.A.	151.4	+	+	—	判定不能
まとめ	判定可能例/全例	5/8	2/8	1/8	判定不能

2. PR陰性例

症例	PR (fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w
M.F.	UD	—	—	—	—
N.I.	UD	—	判定不能	判定不能	判定不能
K.K.	UD	判定不能	判定不能	判定不能	判定不能

B法に従って固定、保存された乳癌乾燥細胞診標本において、PRについて経時的に免疫染色を施行したところ、表6のERの場合と同様の結果をえた。本法による固定、保存を行った乾燥細胞診標本においては長期間保存後正確にPRを同定することは困難である。

表 8. 固定、保存法の相違による染色所見の経時的推移の比較 (C 法)

(+)と判定可能	1w	2w	4w	8w	12w
ER(+)症例	0/8	0/7	0/7	0/7	0/6
PR(+)症例	0/8	0/7	0/7	0/7	

 未施行

乾燥細胞診標本を固定せずにPBSに浸けて4℃にて保存し、免疫染色直前に固定をした場合には細胞核や細胞膜の溶解が早期より全症例において認められ、免疫染色によるER、PRの同定は不可能であった。本法は乾燥細胞診標本の長期保存には適さない。

表 9. 固定、保存法による染色所見の比較 (D 法)

(+)と判定可能	1w	2w	4w	8w	12w
ER(+)症例	5/8	5/8	3/8	1/8	0/6
PR(+)症例	4/8	4/8	1/8	1/8	

 未施行

乾燥細胞診標本を、固定せずに検体保存液内に浸けて-20℃保存し免疫染色直前に固定した場合には、PBSに浸けて4℃にて保存した場合に比べて核や細胞質の溶解はより軽度であるが、1週間後には約半数の症例が免疫染色によるER、PRの同定が困難となり、長期保存はできない。



表 10. 経時的免疫染色検討症例

症例番号	氏名	年齢	臨床病期	病理組織型	n	ER / PR (fmol / mg)
1	K.W.	60	T2N0M0, StageII	2a2	n1 $\alpha$	5.1 / 31.0
2.	H.S.	72	T1N0M0, StageI	2a1	n0	49.7 / 95.1
3.	S.KU.	67	T1N0M0, StageI	2a2	n0	UD / UD
4.	Y.I.	62	T1N1aM0, StageI	2a2	n1 $\alpha$	167.0 / 316.9
5.	M.O.	46	T1N0M0, StageI	2a2	n1 $\alpha$	57.8 / UD
6.	K.O.	60	T2N0M0, StageII	2a2	n0	4.7 / UD
7.	M.K.	65	T2N1bM0, StageII	2a2	n2	7.5 / UD
8.	M.T.	50	T2N0M0, StageII	2a2	n1 $\beta$	234.7 / 40.0
9.	R.A.	41	T1N0M0, StageI	2a2	n0	20.9 / 309.0
10.	K.U.	37	T2N0M0, StageII	2a1	n0	20.1 / UD
11.	A.S.	55	T1N0M0, StageI	2a1	n0	UD / UD
12.	H.K.	39	T1N0M0, StageI	2a2	n0	nd
13.	C.S.	67	T1N0M0, StageI	2a3	n1 $\alpha$	64.1 / 9.1
14.	Y.T.	47	T2N0M0, StageII	2b3	n1 $\beta$	69.5 / UD
15.	Y.A.	45	T1N0M0, StageI	2a2	n1 $\alpha$	53.5 / 255.0
16.	S.K.	53	T1N0M0, StageI	1a	n0	16.0 / 252.0
17.	M.F.	52	T1N0M0, StageI	2a2	n1 $\alpha$	UD / UD
18.	H.O.	41	T1N0M0, StageI	2a2	n0	9.6 / 38.5
19.	Y.H.	41	T1N0M0, StageI	2a1	n0	nd
20.	N.I.	65	T1N0M0, StageI	2a1	n0	UD / UD
21.	A.A.	37	T1N0M0, StageI	2a2	n0	nd
22.	N.Y.	72	T2N0M0, StageII	2a3	n1 $\alpha$	22.5 / 169.3
23.	K.K.	44	T1N0M0, StageI	2a1	n0	UD / UD
24.	Y.Y.	51	T2N2M0, StageIIa,	2a2	n1 $\beta$	57.2 / UD
25.	Y.S.	50	T2N1aM0, StageII	2a2	n2	31.7 / 78.5
26.	E.A.	78	T4aN0M0, StageIIb	2a1	n0	58.0 / 151.4

UD: 測定感度以下、nd: 未施行

生検、あるいは根治手術のために切除された乳癌症例より得られた26検体より多数の乾燥細胞診標本を作製し、A法に従って固定後検体保存液内に漬けて-20℃にて保存した後経時的に免疫染色を施行し、判定結果の推移について検討した。各症例のER、PRの含有量については新鮮凍結切片における免疫染色所見にて判定したが、EIA定量検査が可能であったものは測定結果を示した。

組織型については以下の通りに略記した。1a: noninvasive ductal carcinoma, 2a1: invasive papillotubular carcinoma, 2a2: invasive solidotubular carcinoma, 2a3: invasive scirrhous carcinoma, 2b3: invasive lobular carcinoma

表 11. 経時的に免疫染色所見を検討したER(+)症例

症例	ER(fmol/mg prot.)	1w	2w	4w	8w	12w	16w
K.W.	5.1	+	+	+	+		
H.K.	49.7	+	+				
Y.I.	167.0	+	+	+	+		
M.O.	57.8	+	+	+	+		
M.K.	7.5	+	+	+			
M.T.	234.7	+	+	+	+		
R.A.	20.9	+	+	+	+		
K.U.	20.1	+	+	+	+		
C.S.	64.1	+	+	+	+	+	+
Y.T.	69.5	+	+	+	+	+	
Y.A.	53.5	+	+	+	+	+	+
S.K.	16.0	+	+	+	+		
H.O.	9.6	+	+	+	+	+	
Y.H.	nd	+	+	+	+		
N.Y.	22.5	+	+	+	+	+	
A.A.	nd	+	+	+	-	+	
Y.Y.	57.2	+	+	+	+	+	
Y.S.	31.7	+	+	+	+	+	
E.A.	58.0	+	+	+	+	+	
まとめ	判定可能/全例	19 / 19	19 / 19	18 / 18	16 / 17	8 / 8	2 / 2

nd:測定せず

 未施行

新鮮凍結切片における免疫染色によりER陽性と判定された19症例よりえられた乾燥細胞診標本をA法に従って固定、保存し、経時的に免疫染色を施行してERの同定を行い、保存期間による判定結果の推移について検討した。8週間以上たっても正確な同定が可能である。

表 1 2. 経時的に免疫染色所見を検討したER(-)症例

症例	ER(fmol / mg prot)	1w	2w	4w	8w	12w
S.K.	UD	—	—	—		
K.O.	4.7	—	—	—	—	
A.S.	UD	—	—	—	—	
H.K.	nd	—	—	—	—	
M.F.	UD	—	—	—	—	—
N.I.	UD	—	—	—	—	—
K.K.	UD	—	—	—	—	—

UD: 測定感度以下

未施行

新鮮凍結切片における免疫染色によりER陰性と判定された7症例よりえられた乾燥細胞診標本について、表11と同様の検討を行った。全保存期間を通じてER陰性と正確に同定可能であった。

表 13. 経時的に免疫染色所見を検討したPR(+)症例

症例	PR(fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w	12w	16w
K.W.	31.0	+	+	+			
H.S.	95.1	+	+				
Y.I.	316.9	+	+	+	+		
M.O.	UD	+	+	+	+		
M.T.	40.0	+	+	+	+		
R.A.	309.0	+	+	+	+		
C.S.	9.1	+	+	+	+	+	+
Y.A.	255.0	+	+	+	+	+	+
S.K.	252.0	+	+	+	+		
H.O.	38.5	+	+	+	+	+	
Y.H.	nd	+	+	+	+		
N.Y.	169.3	+	+	+	+	+	
A.A.	nd	+	+	+	—	+	
Y.Y.	UD	+	—	+	+	+	
Y.S.	78.5	+	—	+	+	+	
E.A.	151.4	+	+	+	+		
まとめ	判定可能例/全例	16 / 16	14 / 16	15 / 15	13 / 14	7 / 7	2 / 2

nd: 測定せず、 UD: 測定感度以下

 未施行

新鮮凍結切片におけるPR免疫染色にて30%以上の腫瘍核が染色され、PR陽性と判定された16症例よりえられた乾燥細胞診標本についてもA法に従って固定、保存を行い、経時的に免疫染色を施行してその判定結果の推移について検討した。ERの場合と同様に、保存開始後8週間以上経過しても正確な同定が可能と考えられた。

表 1 4. 経時的に免疫染色所見を検討したPR(-)症例

症例	PR(fmol / mg prot.)	1w	2w	4w	8w	12w
S.K.	UD	—	—	—		
M.K.	UD	—	—	—		
K.O.	UD	—	—	—	—	
K.U.	UD	—	—	—	—	
A.S.	UD	—	—	—	—	
H.K.	nd	—	—	—	—	
Y.T.	UD	—	—	—	—	—
M.F.	UD	—	—	—	—	—
N.I.	UD	—	—	—	—	—
K.K.	UD	—	—	—	—	—

nd: 測定せず      UD: 測定感度以下

 未施行

新鮮凍結切片における免疫染色にてPR陰性と判定された10症例からえられた乾燥細胞診標本を、A法に従って固定、保存し経時的に免疫染色を施行し、その判定結果について検討した。全保存期間を通じてPR陽性と後判定された標本はなかった。

表11~14をまとめると、Paraformaldehyde系の固定液で固定し、検体保存液内につけて-20℃にて固定した乾燥細胞診標本においては、免疫染色によるER、PRの正確な同定が、固定後8週間以上経過しても可能であると考えられた。



表15. EIA法、免疫細胞化学的同定法、免疫組織化学的同定法の相関

1. ER $\geq$ 5.0 fmol/mg prot.をER陽性例とした場合の免疫染色による同定法との一致率

	細胞診標本にてER陽性	細胞診標本にてER陰性
凍結切片にてER陽性	17	0
凍結切片にてER陰性	0	6

	EIAにてER陽性	EIAにてER陰性
免疫染色にてER陽性	17	0
免疫染色にてER陰性	0	6

ERに関してはEIA法、細胞診標本における免疫細胞化学的判定、新鮮凍結切片における免疫組織化学的判定結果が全て一致する。

2. PR $\geq$ 5.0 fmol/mg prot.をPR陽性例とした場合の免疫染色による同定法との一致率

	細胞診標本にてPR陽性	細胞診標本にてPR陰性
凍結切片にてPR陽性	14	0
凍結切片にてPR陰性	0	9

	EIAにてPR陽性	EIAにてPR陰性
免疫染色にてPR陽性	12	2
免疫染色にてPR陰性	0	9

EIA法で陰性と判定された2症例が免疫染色による同定法ではいずれも陽性と判定された。免疫染色による同定法に関してはERの場合と同じく細胞診標本、新鮮凍結切片における判定結果が完全に一致した。

表 16. 穿刺吸引細胞診検体、凍結切片における免疫染色による判定結果とEIA法による定量値の比較

症例	FNA(ER/PR)	凍結切片	EIA(ER/PR) fmol / mg prot	備考
1. M.O.	- / -	+ / +	57.8 / UD	sampling errorと思われる
2. K.O.	- / -	- / -	UD / UD	
3. M.K.	+ / -	+ / -	7.5 / UD	
4. R.A.	+ / +	+ / +	20.9 / 309.0	
5. M.T.	+ / *fail	+ / +	234.7 / 40.0	*細胞数少ない
6. Y.T.	+ / -	+ / -	69.5 / UD	
7. Y.A.	+ / +	+ / +	53.5 / 255	
8. T.S.	+ / +	+ / +	7.3 / 1.7	
9. M.F.	- / -	- / -	UD / UD	
10. Y.Y.	+ / +	+ / +	57.2 / UD	
11. N.Y.	+ / +	+ / +	22.5 / 169.3	
12. K.K.	- / -	- / -	UD / UD	
13. Y.S.	+ / +	+ / +	31.7 / 78.5	
14. H.T.	+ / +	+ / +	62.4 / 225.9	
15. K.U.	- / -	- / -	UD / UD	
16. E.A.	+ / +	+ / +	58.0 / 151.4	
17. S.O.	+ / +	+ / +	58.3 / 26.6	
18. T.O.	- / -	- / -	UD / UD	
19. M.S.	- / -	- / -	UD / UD	
20. A.I.	- / -	- / -	UD / UD	

## UD: 測定感度以下

乳癌20症例にて手術前に穿刺吸引細胞診検体をえて乾燥細胞診標本を作製し、4% PFA液あるいはZamboni 液にて固定し、検体保存液中に浸けて-20℃にて保存した後免疫染色し、ER、PRの定性的判定を行った。判定結果を、切除標本の新鮮凍結切片における免疫染色所見による判定結果、EIA法による定量的測定結果と比較した。乳癌細胞核内のER、PRの分布については凍結切片における免疫染色のほうが定量的測定法より実状を反映しているといわれているので、穿刺吸引細胞診検体を免疫染色して判定した結果がこれとどの程度一致するか検討した。症例1は、穿刺吸引細胞診検体をえる際に腫瘍組織におけるER、PR分布の不均一性に原因して3種類の測定結果に著しい解離を生じた。穿刺吸引細胞診標本を用いた免疫細胞化学的同定法の、新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学的同定法に対するsensitivity, specificityを示す。

	sensitivity	specificity
ER	12/13=92.3%	7/7=100%
PR	9/10=90%	9/9= 100%

表17. 小腫瘍症例よりえられた細胞診検体によるER, PRの判定結果

症例	臨床病期	腫瘍径	病理組織型	採取法	ER / PR
1. H.K.	T1N0M0, Stage I	0.8cm	2a1	捺印	- / -
2. Y.H.	T1N0M0, Stage I	1.3cm	2a2	捺印	+ / +
3. A.A.	T1N0M0, Stage I	0.5cm	2a1	捺印	+ / +
4. T.N.	T1N0M0, Stage I	0.6cm	2a1	捺印	+ / +
5. S.T.	T1N0M0, Stage I	0.8cm	2a2	捺印	+ / +
6. Y.A.	T1N0M0, Stage I	1.3cm	2a2	捺印	+ / +
7. S.N.	T1N0M0, Stage I	0.8cm	2a1	捺印	- / -
8. F.K.	T1N0M0, Stage I	1.5cm	2a2	FNA	- / -

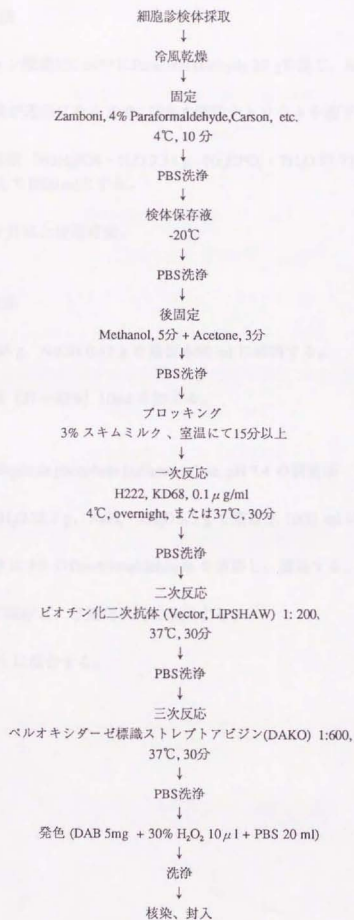
T1乳癌症例 7例において切除された腫瘍断面より乾燥細胞診標本を作成し、A法に従って固定、保存を施した後免疫染色にてER、PRの判定を行った。手術を拒否した1例においては穿刺吸引細胞診標本を用いた。全例ER、PRの判定が可能であり、判定結果に基づいて内分泌療法への適応を決定した。腫瘍径の小さな症例においては定量的測定のために充分な量の検体を使用することは困難なことがあるので、細胞診検体を用いた免疫染色法による判定が適している。穿刺吸引細胞診検体を用いれば、ER、PRを始めとする治療や予後に関する諸因子を手術前に知ることができる。

表 18. 切除不能症例におけるER, PRの判定結果

症例	年齢	臨床病期	検体採取部位	検体採取法	判定結果 ER / PR
1. H.K.O.	53	T3N0M1, StageIV	乳腺	FNA	- / -
2. Y.T.	47	再発	乳腺	FNA	- / -
3. T.O.	72	再発	胸壁	FNA	- / +
4. Y.K.	50	T4aN0M1, StageIV	乳腺	FNA	- / -
5. S.W.	63	再発	右鎖骨上リンパ節	FNA	+ / -
6. M.M.	69	T4cN3M1, StageIV	左鎖骨上リンパ節	FNA	+ / +
7. K.S.	74	T4cN3M0, StageIV	乳腺	FNA	- / -

局所進行乳癌症例や術後再発症例においては、病巣が切除不能であるために内分泌療法の適応を決定するために必要な検体がえられないことが多い。穿刺吸引細胞診検体はこのような症例においても採取可能であるので、本検体より乾燥細胞診表保温を作成し免疫染色を施行すればER、PRの判定が可能である。表17の7症例はいずれも切除不能の症例ばかりであったが、外来初診時に穿刺吸引細胞診検体を採取して固定、保存した後に免疫染色を施行しER、PRの判定を行った。症例M.M.は判定結果に基づいて施行した内分泌療法により著明な臨床症状の改善を認めた。

図1. 乾燥細胞診標本を用いた免疫染色のための検体固定、保存法





## 図2. 固定液の調整法

### Zamboni液の調整法

1. 飽和ピクリン酸液150 ml中にParaformaldehyde 20 gを混じ、60℃に熱する。
2. 混合した液が透明になるまで2.52%水酸化ナトリウムを滴下する。
3. リン酸緩衝液 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  3.31 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  33.77g, 蒸留水 1000 ml)を加えて1000 mlとする。

室温にて6ヶ月以上使用可能。

### Carson液の調整法

1.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.86 g,  $\text{NaOH}$  0.42 g を蒸留水90 ml に溶解する。
2. ホルマリン液 (37~40%) 10mlを加える。

### 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline, pH 7.4 の調整法

1.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  28.7 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.3 g を蒸留水 1000 ml に溶解する。
2. 60℃の蒸留水に8%のParaformaldehydeを溶解し、濾過する。

調整後4℃にて保存し、2週間以内に使用する。

3. 使用直前に1:1に混合する。

図3. EIA法によるER、PRの定量測定

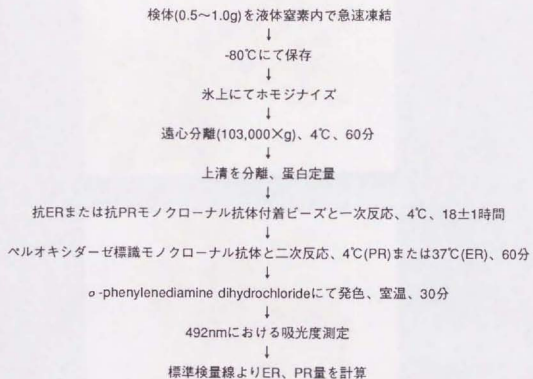
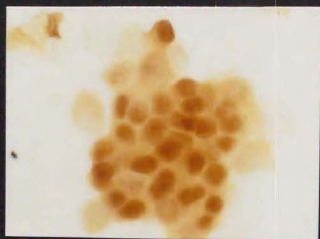
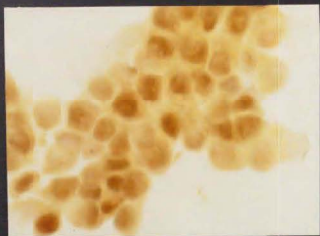


図4. 固定液による E R、P R 染色所見の比較(I)



症例 R. A.

上段：Carson液固定

中段：4% Paraformaldehyde固定

下段：Zamboni液固定

3種類のParaformaldehyde系固定液のうちZamboni液による固定を施行した細胞診標本の染色所見が最も鮮明であり、Carson液にて固定した場合はDAB粒子がやや粗造になる傾向がある。

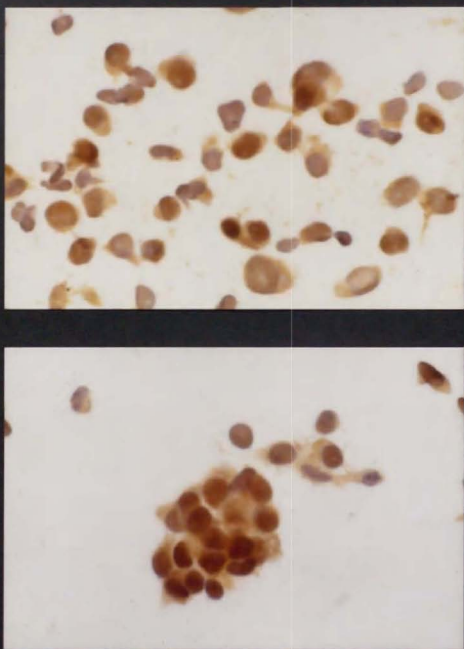
図5. 固定液による E R、P R の染色所見の比較(II)



症例 E. A.  
上段：Zamboni液固定  
下段：95% Ethanol固定

95% Ethanol にて固定すると染色強度が著しく低下する。95% Ethanol はホルモンレセプターの免疫染色のための固定液には適していない。

図6-1. 固定、保存法によるERの免疫染色所見の比較(A法)



症例 N. Y.

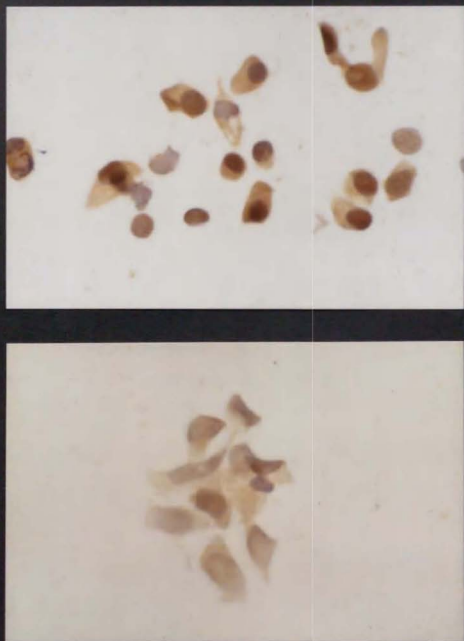
上段：保存後1週間

下段：保存後8週間

乾燥細胞診標本をParaformaldehyde系固定液にて固定し、検体保存液に浸けて-20℃にて保存すると保存開始後8週間経過しても信頼性のあるERの免疫細胞化学的同定が可能である。



図6-2 固定、保存法による ER の免疫染色所見の比較 (B法)



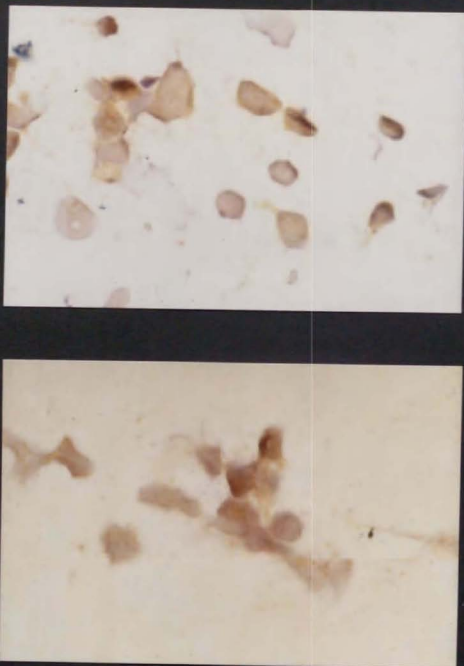
症例 N. Y.

上段：保存後1週間

下段：保存後8週間

細胞診標本を固定後、PBSに浸けて4℃にて保存した場合には保存開始後1週間でERの染色強度が低下し始め、8週間目にはERの同定が不可能とる。

図6-3 固定、保存法によるERの免疫染色所見の比較(C法)



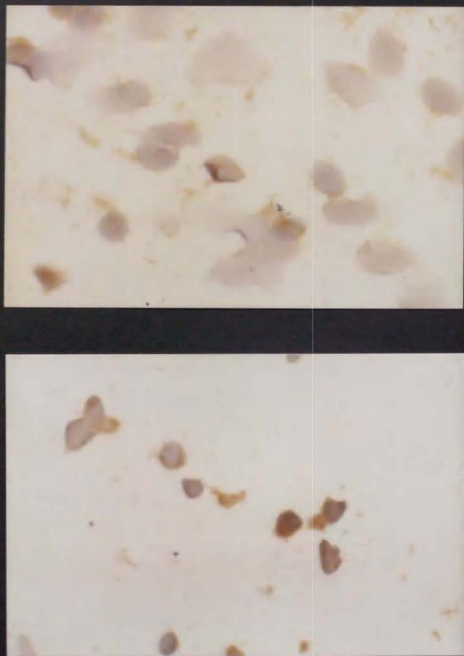
症例 N. Y.

上段：保存後1週間

下段：保存後8週間

細胞診標本を固定せずにPBASに浸けて4℃にて保存すると、保存開始後1週間に細胞形態の破壊のためにERの同定は不可能となる。

図6-4 固定、保存法による ER の免疫染色所見の比較 (D法)



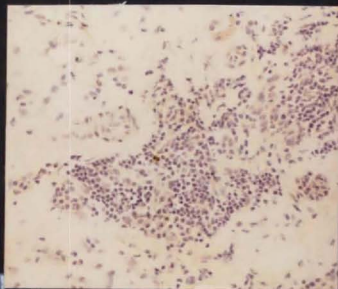
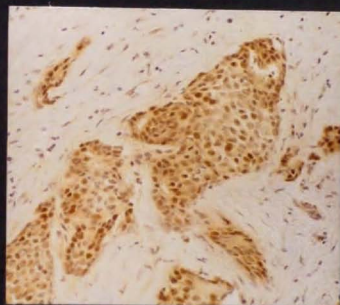
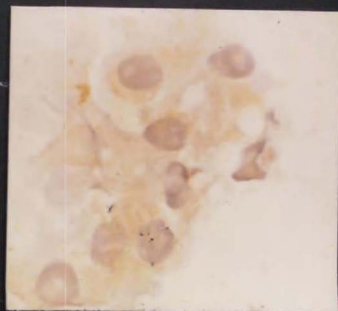
症例 N. Y.

上段：保存後 1 週間

下段：保存後 8 週間

細胞診標本を固定せずに検体保存液に漬けて-20℃にて保存しても細胞形態の破壊を免れず、8週間後にはERの免疫細胞化学的同定は困難となる。

図7. 〔臨床応用〕 穿刺吸引細胞診検体におけるERの免疫染色



症例 N.Y.

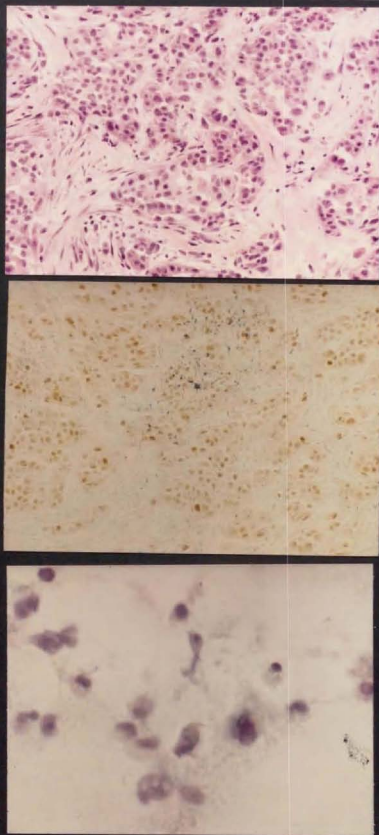
上段：穿刺吸引細胞診標本  
下段：新鮮凍結切片  
いずれもER(+)

症例 N.I.

上段：穿刺吸引細胞診標本  
下段：新鮮凍結切片  
いずれもER(-)



図8. 穿刺吸引細胞診における免疫染色にて false negative となった症例



症例 M. O.

上段：新鮮凍結切片HE所見

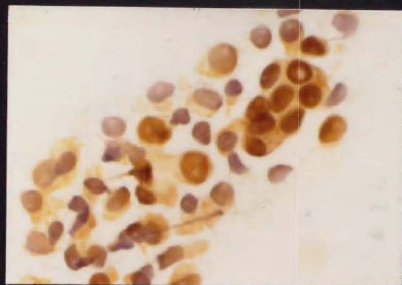
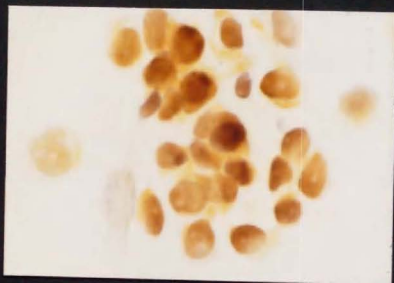
中段：新鮮凍結切片におけるER免疫染色所見

下段：穿刺吸引細胞診標本におけるER免疫染色所見

症例 M. O. は、間質に富んだ組織型であり、また腫瘍細胞のER含有量に不均一性が目立つ。そのために穿刺吸引細胞診にては sampling error による false negative の結果となったと思われる。



図9. [臨床応用] 小腫瘍症例におけるERの同定



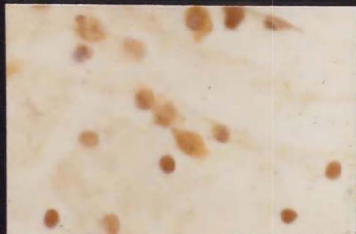
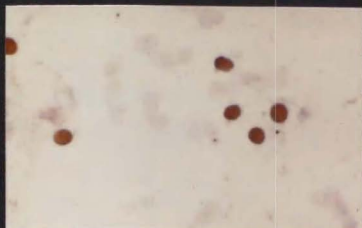
症例 A. A.

上段：生検標本マクロ所見

中断：捺印細胞診標本におけるER免疫染色所見

下段：捺印細胞診標本におけるPR免疫染色所見  
いずれも保存後12週間後に免疫染色した。

図10-1 [臨床応用] 切除不能症例におけるER、PRの同定 (I)



症例 M. M.

上段：臨床所見

中段：細胞診標本におけるER陽性免疫染色所見

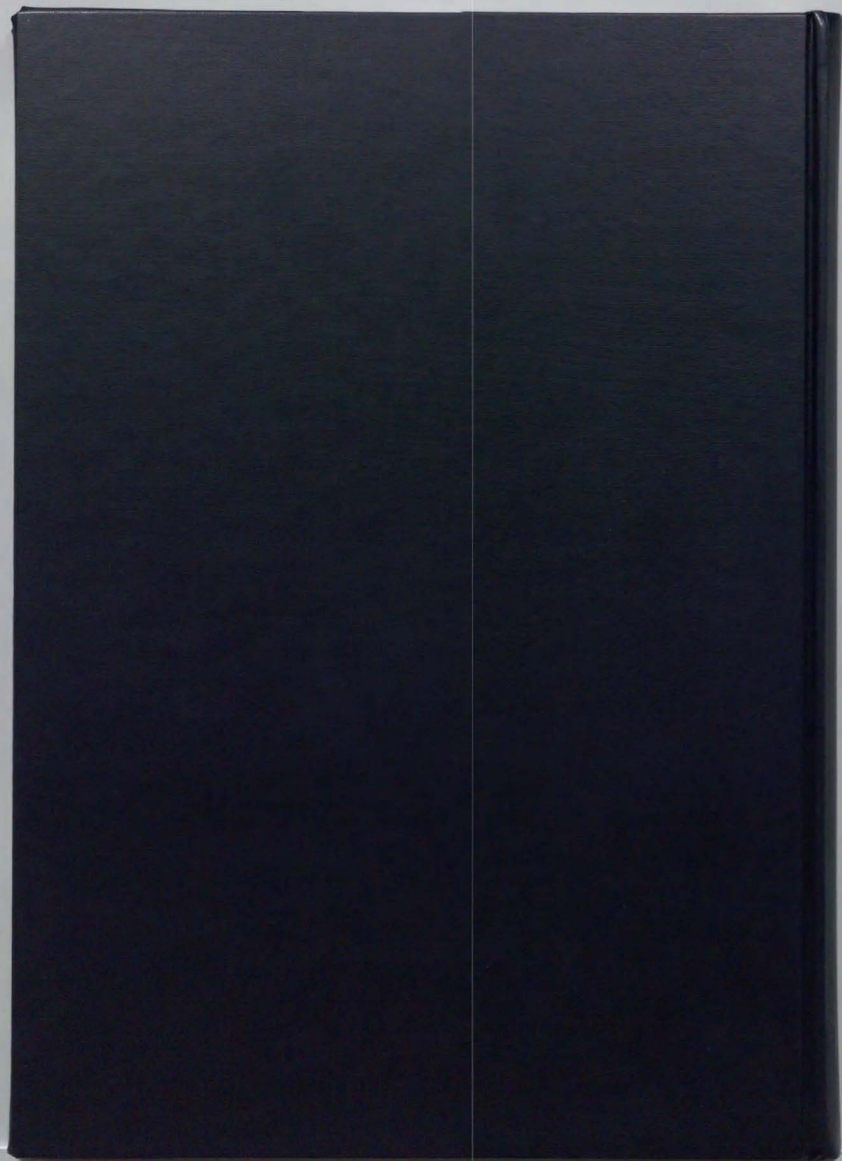
下段：細胞診標本におけるPR陽性免疫染色所見

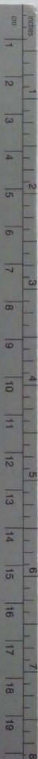
本症例は胸壁に浸潤した原発病巣の他に鎖骨上リンパ節転移、広範な骨転移を有しており、衰弱が著しく生検手術には耐えられない状態であった。外来診察室にて鎖骨上リンパ節から穿刺吸引細胞診標本をえて、免疫細胞化学的にホルモンレセプターを同定した。

図10-2 【臨床応用】 切除不能症例における ER、PRの同定 (II)



穿刺吸引細胞診標本を免疫染色した結果ホルモンレセプター陽性であることが明らかとなったので内分泌療法としてMPAを投与した。約8ヶ月後の臨床所見においては原発病巣の著明な縮小及び骨転移症状の改善が認められ、内分泌療法は極めて有効であった。





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

