

# 伴侶動物の腫瘍細胞診の精度向上のための基礎的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

島（澤）真理子

2018年3月

# 目 次

総緒	1
----	---

## 第 1 章：イヌとネコの腫瘍細胞診における乾燥迅速パパニコロウ染色の有用性

1) 緒言	4
2) 材料および方法	6
3) 結果	8
4) 考察	10
5) 小括	13
6) 図および表	14

## 第 2 章：イヌの腫瘍細胞診における迅速免疫染色法の開発：サイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクの検出

1) 緒言	22
2) 材料および方法	24
3) 結果	33
4) 考察	38
5) 小括	46
6) 図および表	49

## 第 3 章：イヌとネコのリンパ球免疫表現型の分類のための迅速多重蛍光抗体法

1) 緒言	67
2) 材料および方法	69

3) 結果	73
4) 考察	76
5) 小括	80
6) 図および表	82
総括	89
謝辞	92
参考文献	93

## 総 緒

細胞診は臨床病理学（臨床検査学）の中核を担う検査法の一つであり、特に伴侶動物では腫瘍性疾患の診断のために実施されることが多い。一般的には、細針吸引法など簡便かつ侵襲性の低い手法を用い、標本の作製から診断まで比較的短時間で実施できる。サンプリング時には麻酔の必要はなく、鎮静も不要である場合が多い(Przeździecki et al., 2015)。そのため、伴侶動物の臨床現場では実施されることが多いが、その診断精度は決して高いものとはいえず、細胞診で腫瘍性疾患の確定診断を得ることは難しいのが現状である。

細胞診には採取された細胞の染色が必須であるが、その染色には人医学と獣医学で大きな違いがある。人医学における細胞診では、サンプルは採材後すぐにアルコールにより湿固定されてパパニコロウ染色が施される。この染色の工程は複雑であり、サンプル採取から診断まで臨床検査技師（細胞検査士）による一貫した作業が行われている。一方、獣医学における細胞診は臨床現場で簡易的に実施されることが多く、一般的にサンプルは採取後に乾燥固定してギムザ染色により診断される(Meinkoth et al., 2014)。ギムザ染色で得られる情報量はパパニコロウ染色より少ないとされており、これも伴侶動物臨床での細胞診の診断精度が低い一因と考えられる。

腫瘍性疾患では、患者の予後の推定や治療法の選択のために腫瘍細胞の由来を特定することが重要であるが、一般染色での分類が困難であることも多い。そのような場合、免疫細胞化学（immunocytochemistry; ICC）を用いた診断マーカーの検出が有用であり、人医学では予後判断や治療法の選択を目的として様々なマーカーの検出が行われている。例えば、乳腺腫瘍を例に挙げると、ヒト上皮成長因子受容体関連物質 2（HER2; human EGFR-related 2）受容体やエストロゲンホルモン受容体などの特定の分子を検出することでより効果的な治療法を選択することができる(Skoog and Tani, 2011)。さらに、ICC は腫瘍の

外科的切除における術中診断にも応用されており、そのための迅速染色法の技術も進んでいる(Francz et al., 2011; Moriya et al., 2016; Walke et al., 2017)。一方、獣医学領域の細胞診では、細胞診での ICC は十分に普及していない。ICC を利用して診断したケースレポートは存在するものの(Colledge et al., 2013; Fritz et al., 2005)、細胞診における ICC の感度、特異性、有用性および診断的意義については十分な検討が行われていない。

近年、伴侶動物の医療は大きく発展しており、特に腫瘍性疾患では治療の高度化が進んでいる。そのためには診断技術の進歩が必須であり、意識下の動物で非侵襲的に検査が行える細胞診はより重要な臨床検査になっていくと考えられる。しかしながら、ギムザ染色のみで獣医師の主観に頼って行われる検査には限界がある。この限界を打ち破って獣医細胞診をより高度な診断技術として確立するためには、動物サンプルを用いた基礎研究の積み重ねによるエビデンスの蓄積が必要である。

そこで本研究では、伴侶動物の腫瘍細胞診の高度化に向けた基礎的研究を実施した。第 1 章では、人医の細胞診で主流であるパパニコロウ染色について、伴侶動物の細胞診への有用性を検討した。イヌおよびネコから得た細胞診標本にパパニコロウ染色とギムザ染色を施し、腫瘍の悪性度を定量的に解析することで、パパニコロウ染色の有用性を客観的に評価した。第 2 章では、細胞診における迅速 ICC の開発およびその臨床的有用性について検討を行った。イヌから得た細胞診標本について、サイトケラチン（上皮系マーカー）とビメンチン（間葉系マーカー）に対する迅速 ICC を開発し、各々の臨床的な有用性について統計学的に解析した。第 3 章では、伴侶動物で多く発生するリンパ腫について細胞診での免疫表現型（B 細胞型/T 細胞型）の鑑別を目的とした迅速 ICC を開発し、さらに、その臨床応用について検討した。CD79 $\alpha$ （B 細胞マーカー）と CD3（T 細胞マーカー）を同時検出するための迅速多重蛍光抗体法を確立し、遺伝子クローナリティ解析の結果を比較することによりイヌとネコのリンパ腫の診断における有用性を検証した。

## 第1章

イヌとネコの腫瘍細胞診における  
乾燥迅速パパニコロウ染色の有用性

## 緒 言

獣医学領域における細胞診は、一般的にロマノウスキー染色（ギムザ染色、簡易ギムザ染色など）で行われている。一方、人医の細胞診で主流の染色法はパパニコロウ (Papanicolaou; Pap) 染色であり、特に子宮癌や肺癌のスクリーニング検査に汎用されている (Papanicolaou, 1942)。Pap 染色の特徴としては核の染色にヘマトキシリンを使用することが挙げられ、核小体やクロマチンパターンなど核の微細形態を観察するのに適している。このため、Pap 染色は腫瘍細胞の悪性度診断に適しており (Raskin, 2001)、現代の人医の腫瘍細胞診ではゴールドスタンダードといえる染色法である (Mehta et al., 2010; Yang et al., 2006)。このような特性をもつ Pap 染色は、伴侶動物の腫瘍細胞診にも有用であると考えられるが、ギムザ染色と異なり、標本の湿固定（標本が乾燥する前にエタノールで固定する）が必要であり、また、染色工程も複雑である。そのため、伴侶動物の臨床の現場で利用することは難しい。

この Pap 染色の染色工程の複雑さは、人医の細胞診でも障壁となることがある。そのため、Pap 染色を迅速に行うための改良が行われており、1995 年には Yang らによって乾燥固定標本を用いた迅速 Pap 染色法が発表された (Yang, 1995; Yang and Alvarez, 1995)。この迅速乾燥 (rapid-air-dry; RAD) Pap 染色は、従来の複雑な染色工程を簡略化して乾燥標本にも適応できるようにしたものであるが、その染色性は従来法と同等あるいはそれ以上で (Einstein et al., 1997)、針吸引細胞診 (Lemoset al., 1997; Yang and Alvarez, 1995)、搔爬細胞診 (Basolo et al., 1999; Christensen et al., 2008)、体腔内貯留液の細胞診 (Yang, 2003) などに広く利用されている。

RAD-Pap 染色と従来の Pap 染色の最大の違いは標本の固定法である。従来の Pap 染色では湿固定標本が使用されていたが、RAD-Pap 染色では乾燥標本を用いることができる。伴侶動物の臨床現場では、湿固定が必要な従来の Pap 染色を細胞診に使用することは困難であるが、乾燥固定標本で染色できる RAD-Pap 染色であればその利便性は高いと考えられ

る。実際にイヌとウマの細胞診での RAD-Pap 染色の応用例があり、その有用性は高いと報告されている(Jörundsson et al., 1999; Pérez et al., 2005)。しかしながら、伴侶動物の腫瘍細胞診でも RAD-Pap 染色がギムザ染色に比べて優位であるのかについては十分な検証が行われていない。そこで本章では、イヌの腫瘍細胞診標本に RAD-Pap 染色を適用し、腫瘍の悪性度評価におけるギムザ染色との違いを比較検討した。



## 材料および方法

本実験は鹿児島大学の動物実験指針に従い実施された（認証番号 VM15040）。

### 1. サンプル

鹿児島大学附属動物病院で外科的に摘出されたイヌおよびネコの腫瘍組織（n=57）からスタンプ標本を作製した。採取した腫瘍組織はすべて組織病理学的に診断されており、その内訳は下記の通りである（表 1-1）。

上皮系腫瘍：肛門周囲腺腫（n=5）、扁平上皮癌（n=5）、腺癌（n=4）、皮脂腺上皮腫（n=3）、移行上皮癌（n=3）、副腎皮質腺腫（n=2）、乳腺未分化癌（n=2）、乳腺管状乳頭状癌（n=2）、腺扁平上皮癌（n=1）、アポクリン腺癌（n=1）、乳腺良性混合腫（n=1）、肝細胞癌（n=1）、マイボーム腺腫（n=1）、乳腺腺腫（n=1）、腎細胞癌（n=1）、皮脂腺腫（n=1）

間葉系腫瘍：悪性黒色腫（n=4）、線維肉腫（n=3）、血管肉腫（n=3）、骨肉腫（n=2）、軟骨肉腫（n=1）、脂肪肉腫（n=1）、悪性末梢神経鞘腫（n=1）

円形細胞腫瘍：皮膚組織球腫（n=4）、リンパ腫（n=3）、組織球肉腫（n=1）

細胞診標本は作製後すぐに風乾し、24 時間以内に RAD-Pap 染色およびギムザ（Wright's Giemsa あるいは May-Grünwald-Giemsa）染色を施した。本章での RAD-Pap 染色は、過去に報告されたプロトコル(Minato, 2000)を改良して実施した（表 1-2）。

### 2. 形態計測

RAD-Pap およびギムザ染色した標本を光学顕微鏡で観察し、各サンプルについてデジタル顕微鏡写真を平均 3 枚撮影した。各サンプルから約 20 個の腫瘍細胞を抽出し、デジ

タル画像解析ソフト (SigmaScan Pro 5.0; Systat Software, Chicago, IL, USA.) を用い

(A) 核小体数、(B) 細胞の最大直径、(C) 核の最大直径および (D) 核小体の最大直径を計測した。また、核/細胞質比 (C/B) および核小体/核比 (D/C) を算出した。

### 3. 統計解析

統計学的解析には PASW software (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA.) を使用した。データは平均値±標準偏差で表し、細胞の大小不同性などバラツキを表す指標には標準偏差を用いた。RAD-Pap 染色とギムザ染色標本における各パラメータの相関は Pearson の相関係数を用いて解析した。各パラメータにおける RAD-Pap 染色とギムザ染色の差は Mann-Whitney *U* 検定で解析した。各パラメータにおける良性腫瘍 (n=14) と悪性腫瘍 (n=31) の差についても Mann-Whitney *U* 検定で解析した。いずれの検定も *P* 値が 5%以下で有意な差とした。なお、円形細胞腫瘍と黒色腫は他の腫瘍とは悪性度の評価が異なるため、有意差の検定から除外した。

## 結 果

### RAD-Pap 染色で得られる細胞診所見の特徴

本章で用いた RAD-Pap 染色のプロトコルには標本の再水和から封入まで 18 の染色工程が含まれるが、染色時間は約 15 分と短時間であった。RAD-Pap 染色をギムザ染色と比較すると、RAD-Pap 染色では標本に塗抹された赤血球が観察されなかった。これはギムザ染色で比較的多量の血液のコンタミネーションが認められる標本でも同様であった。Pap 染色の特徴である多重染色性は、今回用いた RAD-Pap 染色でも十分に保たれていた（図 1-1）。細胞質はその分化度により色分けされ、扁平上皮癌の症例では、腫瘍細胞の細胞が緑色、黄色、オレンジ、赤色など多様な色調を呈した。核小体は鮮明なオレンジ色に染色され、そのサイズや形を容易に観察することができた（図 1-1）。また、核のクロマチンの染色性と分別が良好であり、スムーズ、点状、レース状、ロープ状、凝集およびシミ状など様々なクロマチンパターンの鑑別を容易に行うことができた。さらに、RAD-Pap 染色された細胞は細胞質の透明度が高く、重責した細胞群においても細胞形態の観察を行うことができた。

### 統計解析

RAD-Pap 染色とギムザ染色の関連性を解析した結果、核/細胞質比、核の大きさ、核の大きさのバラツキ、細胞質の広さ、核小体/核比、細胞質の広さのバラツキ、核小体数、核小体/核比のバラツキ、核小体の大きさ、核小体の大きさのバラツキの 10 のパラメータで RAD-Pap 染色とギムザ染色との間に有意な相関が認められた（表 1-3）。核/細胞質比では比較的強い相関が得られたが、その他のパラメータの相関は弱かった。核/細胞質比のバラツキと核小体数のバラツキの 2 項目については有意な相関は検出されなかった。

RAD-Pap 染色とギムザ染色の差について解析した結果、核小体数、核小体数のバラツキ、核小体/核比の 3 つのパラメータで RAD-Pap 染色がギムザ染色よりも有意に高い値を

示した（表 1-4）。一方、細胞質の広さ、核および核小体の大きさにおいてはギムザ染色が RAD-Pap 染色よりも有意に高い値を示した。その他のパラメータでは両染色法の間には有意差は認められなかった。

良性腫瘍と悪性腫瘍を比較した結果、RAD-Pap 染色では、核小体の大きさと核小体/核比のバラツキの 2 項目において、悪性が良性よりも有意に高い値を示した（表 1-5）。その他のパラメータには有意差が認められなかった。ギムザ染色では、細胞の大きさ、核の大きさ、核の大きさのバラツキ、核/細胞質比のバラツキの 4 項目において、悪性が良性よりも有意に高い値を示した。

## 考 察

本章で実施した RAD-Pap 染色は、乾燥標本の再水和から封入まで約 15 分で完了し、通常のギムザ染色よりも短時間で染色を行うことができた。Pap 染色はヘマトキシリン、オレンジ G、ライトグリーンの 3 種類の染色液の性質の違いを利用して細胞を多様に染め分けられる。核はヘマトキシリンで紫色、核小体はオレンジ G でオレンジ色に染色されるが、細胞質は細胞の分化の程度によって色調が変わり、例えば上皮の基底細胞は青から緑色、角化した扁平上皮ではオレンジから赤色に染色され、この色調変化は扁平上皮癌などの診断に重要な所見となる(Lemos et al., 1997)。本章の検索でも、RAD-Pap 染色を施した扁平上皮癌の標本では Pap 染色の特徴である細胞質の色調変化が認められた。これらの特徴は通常のギムザ染色標本では得ることができず、伴侶動物でも多く発生する扁平上皮癌の細胞診には RAD-Pap 染色は有用な診断ツールになると考えられた。

本研究では、細胞診で評価される腫瘍の悪性基準を形態計測学的に評価した。まず、各パラメータについて RAD-Pap 染色とギムザ染色の相関性を解析したところ、最も強い相関が認められたのは核/細胞質比だった。このことから、RAD-Pap 染色では核あるいは細胞質が過度に収縮あるいは膨張の程度にギムザ染色との違いがなく、ギムザ染色と同様の基準で核/細胞質比を核/細胞質比を評価することができることが証明された。一方、その他に 9 個のパラメータで RAD-Pap 染色とギムザ染色との間に有意な相関が検出されたが、その相関係数はいずれも低かった。よって、RAD-Pap 染色とギムザ染色では細胞診で得られる形態学的情報が必ずしも一致しないことが明らかとなった。

一般的に、Pap 染色標本では細胞と核の大きさがギムザ染色標本よりも小さくなる。これは標本の固定と再水和の工程で生じ(Schulte and Wittekind, 1987)、Pap 染色では湿固定により細胞の三次元構造が維持されるが、ギムザ染色標本では乾燥固定により細胞の三次元構造が二次元構造に押しつぶされるためと考えられている(Yang, 1994)。一方、RAD-Pap

染色は乾燥固定を採用するため、理論上では腫瘍細胞の大きさは従来の Pap 染色よりも大きくなる(Raskin, 2001; G. C. Yang, 1994)。しかしながら、今回の観察では、RAD-Pap 染色標本における細胞と核の大きさはギムザ染色よりも依然として小さかった。これは統計学的解析の結果からも明らかであり、RAD-Pap 染色標本での細胞と核の大きさはギムザ染色よりも小さかった。この結果から、細胞や核の大小不動性を解析するためには RAD-Pap 染色はギムザ染色より劣っていると考えられた。実際に、核の大小不同性のパラメータをみると、RAD-Pap 染色では悪性腫瘍と良性腫瘍との間に有意差が認められなかったのに対し、ギムザ染色では悪性腫瘍の方が有意に高い値を示した。

RAD-Pap 染色では、乾燥固定標本を用いるため、染色に際しては最初に標本を再水和する工程が必要である。(Yang, 1995)。標本の再水和に使用する溶液について比較検討した過去の研究では、再水和は生理的食塩水で行うのが最適であると報告されており(Chan and Kung, 1988)、近年行われている RAD-Pap 染色では生理食塩水で標本の再水和が行われている(Kamal et al., 1997; Yang, 2003)。さらに、RAD-Pap 染色で再水和を行う目的の一つとして、細胞診標本にコンタミネーションとして混入する赤血球の排除も挙げられている。腫瘍細胞診ではしばしば血液の混入により腫瘍細胞の形態が干渉されることがあり、標本の再水和と同時に背景の赤血球を溶血させて排除できることは RAD-Pap 染色法の利点と考えられている(Chan and Kung, 1988; Ng et al., 1994)。しかしながら、伴侶動物の細胞診では標本上の赤血球を排除することは決して利点とはいえない。標本上に赤血球が存在しない場合は標本の質(サンプリングの良否)の評価が難しく、また、赤血球は細胞や核小体のサイズを評価するための重要な指標でもある(Raskin, 2001; Tyler et al., 1999)。よって、伴侶動物の細胞診において標本上の赤血球を排除する意義は低く、むしろ赤血球の溶血を起こさずに Pap 染色の多重染色性が維持される方法を開発するべきであると考えられた。

Pap 染色は核の微細構造の観察に優れており、特に核小体はオレンジ色に染色されることでその大きさ、数および形状を詳細に観察することができる。今回用いた RAD-Pap 染色

標本でもこの特徴は再現されており、**RAD-Pap** 染色は核小体の形態観察においてギムザ染色よりも優れていることが確認された。核小体の変化は腫瘍細胞の悪性度評価に重要であり、細胞診で評価する項目として核小体の大型化、複数化、大小不同性、異常形態が挙げられる(Tyler et al., 1999)。今回の形態計測学的解析でも、核小体に関しては多数のパラメータを評価した。その結果、**RAD-Pap** 染色では核小体の大小不同性と核小体/核比のバラツキにおいて悪性腫瘍が良性腫瘍よりも有意に高い値を示した。この結果は、**RAD-Pap** 染色では核小体がオレンジ色に染色して微細な核小体まで観察しやすくなる特性を反映したものであり、**RAD-Pap** 染色が核小体の大きさを評価するのに適していることを示している。一方、細胞の大きさ、核の大きさ、核の大きさのバラツキおよび核/細胞質比のバラツキでは、ギムザ染色のみ悪性腫瘍が良性腫瘍よりも有意に高い値を示し、**RAD-Pap** 染色では有意差は検出されなかった。今回の結果は、細胞診で腫瘍細胞の悪性度を評価するためには、各々の特徴を鑑みた使い分けが必要であることを示唆している。

以上、本章の検索から、**RAD-Pap** 染色がイヌとネコの細胞診においても有用性が高い染色法であることが明らかにされた。特に細胞の分化度の評価や核の微細形態の観察には**RAD-Pap** 染色の有用性は高いと考えられた。一方、赤血球の溶血や細胞サイズの小型といった欠点があることも明らかになった。**Pap** 染色は人医の細胞診では主流の染色法であるが、今回の検索の結果からは伴侶動物の細胞診でギムザ染色にとって代わる染色とは考えられなかった。しかしながら、細胞の分化度や核の評価に優れていることは事実であり、染色も約 15 分と短時間で完了することから、伴侶動物の細胞診でも副次的な染色法として利用されることが期待される。

## 小 括

パパニコロウ (Pap) 染色は人医の腫瘍細胞診において主流の染色法である。しかしながら、複雑な染色工程や固定法の違いにより伴侶動物の細胞診ではほとんど利用されていない。通常の Pap 染色は湿固定を必要とするが、乾燥標本で実施できる迅速 Pap 染色法が近年応用されている。この乾燥迅速 (rapid-air-dry; RAD) Pap 染色法は伴侶動物の細胞診でも利用できると考えられるが、その有用性については評価されていない。そこで本章ではイヌとネコの細胞診における RAD-Pap 染色の有用性を検証した。

鹿児島大学附属動物病院にて外科的に摘出されたイヌの腫瘍組織 (n=57) のスタンプ標本を用いて RAD-Pap 染色とギムザ染色を比較した。デジタル顕微鏡写真から画像解析によって腫瘍の悪性度評価に使われる 12 のパラメータについて定量を行い統計学的に解析した。

RAD-Pap 染色は標本の固定から封入まで 15 分以内に完了することができた。ギムザ染色と比較すると、細胞の分化度による細胞質の染色性の違いや核の微細構造は RAD-Pap 染色がギムザ染色に勝っていた。RAD-Pap 染色では観察される細胞のサイズがギムザ染色よりも小さく、標本上に塗抹された赤血球が観察されない (染色過程で溶血) ことも確認された。統計学的解析の結果、RAD-Pap 染色とギムザ染色では多くのパラメータで低い相関が認められ、両染色で得られる情報が同じでないことが明らかになった。悪性腫瘍と良性腫瘍の比較を行うと、核小体の大きさによる悪性度評価に関しては RAD-Pap 染色の方が優位であるが、細胞や核の大きさと核/細胞質比による悪性度評価ではギムザ染色の方が優位であることが明らかになった。

以上の結果から、伴侶動物の細胞診では RAD-Pap 染色はギムザ染色にとって代わる染色とは考えられなかった。しかしながら、細胞の分化度や核の評価に優れていることは事実であり、診断の補助ツールとしての有用性は高いと考えられた。



## 図および表

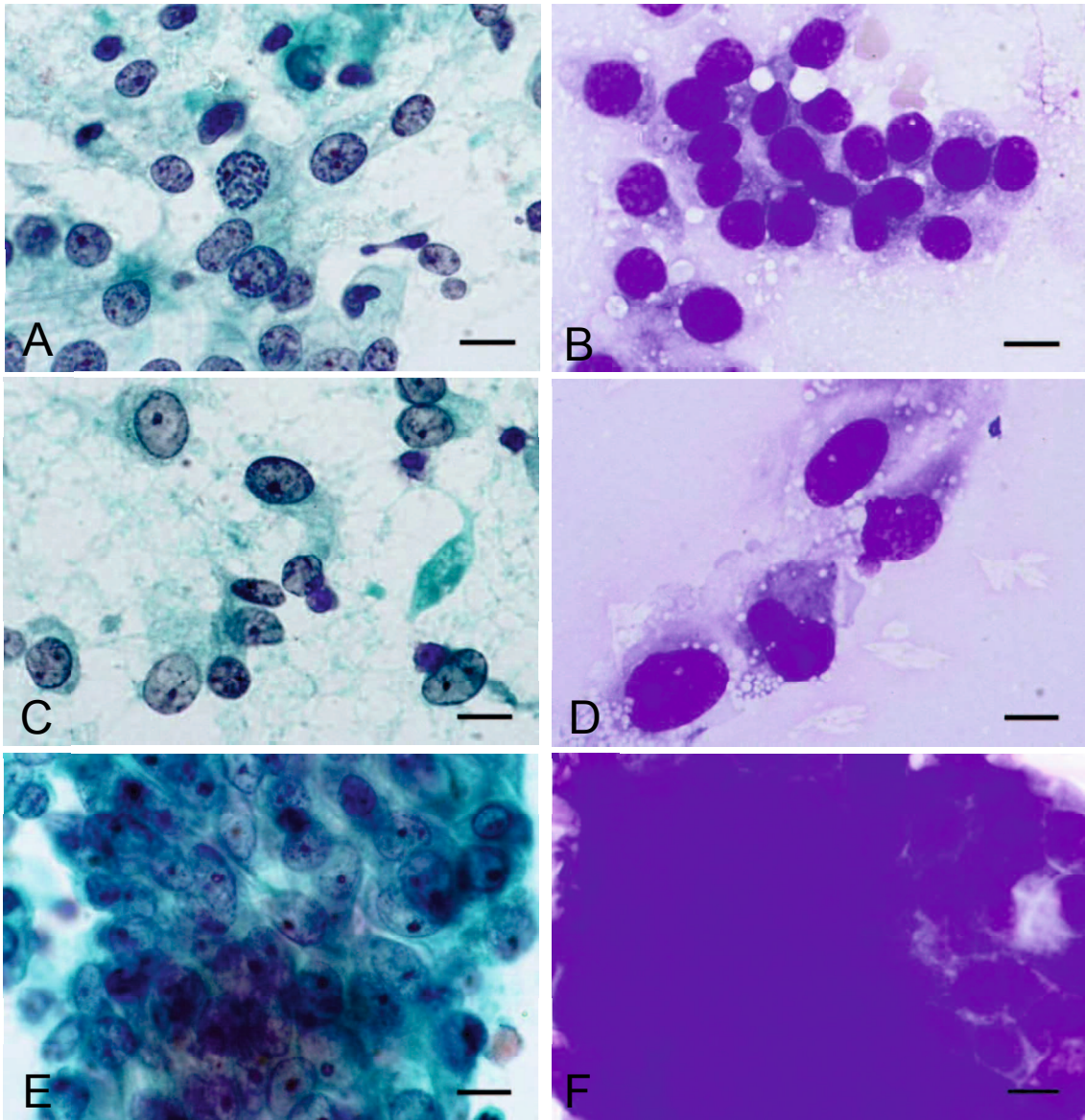


Fig. 1 - 1. Light micrographs from rapid-air-dry (RAD) Papanicolaou (Pap)-and Giemsa-stained samples. A and B: Renal carcinoma from a dog. C and D: Hemangiosarcoma from a dog. E and F: Transitional cell carcinoma from a dog. A, C, and E: RAD-Pap stain. B, D, and F: Giemsa stain. With the RAD-Pap stain, sizes of cells, nuclei, and nucleoli are smaller than those with Giemsa. Multiple minute nucleoli and various chromatin patterns such as smooth, finely stippled, ropy, and clumped are clearly observed with the RAD-Pap stain. In thick specimens, nuclear details are observed with the RAD-Pap stain (Panel E), but not with the Giemsa stain (Panel F). Bars= 10  $\mu$ m.

Table 1-1. List of tumors evaluated in the present study.

	Histopathological diagnosis	Number
Epithelial tumor	Perianal gland adenoma	5
	Squamous cell carcinoma	5
	Adenocarcinoma	4
	Sebaceous epithelioma	3
	Transitional cell carcinoma	3
	Adrenocortical adenoma	2
	Mammary anaplastic carcinoma	2
	Tubulopapillary carcinoma	2
	Adenosquamous cell carcinoma	1
	Apocrine adenocarcinoma	1
	Benign complex adenoma	1
	Hepatocellular carcinoma	1
	Meibomian adenoma	1
	Mammary simple adenoma	1
	Renal carcinoma	1
Sebaceous adenoma	1	
Mesenchymal tumor	Melanoma	4
	Fibrosarcoma	3
	Hemangiosarcoma	3
	Osteosarcoma	2
	Chondrosarcoma	1
	Liposarcoma	1
	Malignant peripheral nerve sheath tumor	1
Round cell tumor	Cutaneous plasmacytoma	4
	Lymphoma	3
	Histiocytic sarcoma	1
Total		57

Table 1-2. Procedure of the rapid-air-dry (RAD) Papanicolaou stain.

Step	Reagent	Amount/duration
1	Physiological saline	30 seconds
2	95% ethanol	30 seconds
3	Alcoholic formalin	10 seconds
4	Tap water	5 slow dips
5	Gill's hematoxylin V*	1 minute
6	Tap water	5 slow dips
7	0.5% HCl in 70% ethanol	3–5 slow dips
8	Tap water	5 minutes
9	95% ethanol	5–10 slow dips
10	Orange G*	1 minute
11	95% ethanol	5–10 slow dips
12	1% acetic acid in 95% ethanol	5–10 slow dips
13	1% phosphotungstic acid in 95% ethanol	5–10 slow dips
14	EA 50*	1 minute
15	95% ethanol	5–10 slow dips
16	100% ethanol	Direct stream
17	Xylene	1 minute (3 changes)
18	Mount coverslip	
Total time		Maximum 15 minutes

\*: Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan.

Table 1-3. Correlations between the RAD- Papanicolaou and Giemsa stains.

Parameter	<i>R</i>
Mean cell size	0.505
Dispersion of cell size	0.415
Mean nucleus size	0.637
Dispersion of nucleus size	0.54
Mean nucleus/cell ratio	0.715
Dispersion of nucleus/cell ratio	<i>NS</i>
Number of nucleoli	0.407
Dispersion of number of nucleoli	<i>NS</i>
Mean nucleolus size	0.341
Dispersion of nucleolus size	0.302
Mean nucleolus/nucleus ratio	0.435
Dispersion of nucleolus/nucleus ratio	0.374

*R*: correlation coefficient, *NS*: not significant.

Table 1-4. Differences between the RAD- Papanicolaou and Giemsa stains.

Parameter	RAD-Pap	Giemsa
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Mean cell size ( $\mu\text{m}$ )	14.57 $\pm$ 4.24*	17.42 $\pm$ 4.45
Dispersion of cell size	119.64 $\pm$ 56.78	121.66 $\pm$ 52.94
Mean nucleus size ( $\mu\text{m}$ )	6.25 $\pm$ 1.22*	8.18 $\pm$ 1.45
Dispersion of nucleus size	38.48 $\pm$ 18.35	41.97 $\pm$ 18.34
Mean nucleus/cell ratio	0.48 $\pm$ 0.13	0.50 $\pm$ 0.13
Dispersion of nucleus/cell ratio	0.10 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.03
Number of nucleoli	1.15 $\pm$ 0.54*	0.47 $\pm$ 0.45
Dispersion of number of nucleoli	0.76 $\pm$ 0.29*	0.51 $\pm$ 0.32
Mean nucleolus size ( $\mu\text{m}$ )	1.32 $\pm$ 0.44*	1.89 $\pm$ 0.43
Dispersion of nucleolus size	12.69 $\pm$ 7.02	15.01 $\pm$ 6.47
Mean nucleolus/nucleus ratio	0.21 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.04
Dispersion of nucleolus/nucleus ratio	0.06 $\pm$ 0.03*	0.05 $\pm$ 0.02

\*: Significantly different from the Giemsa stain.

Table 1-5. Differences between benign and malignant measurements with the RAD- Pap and Giemsa stains

Parameter	RAD-Pap		Giemsa	
	Benign	Malignant	Benign	Malignant
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Mean cell size ( $\mu\text{m}$ )	17.24 $\pm$ 3.75	14.85 $\pm$ 3.75	18.75 $\pm$ 1.60	18.33 $\pm$ 4.47
Dispersion of cell size	105.24 $\pm$ 37.47	131.74 $\pm$ 61.17	103.99 $\pm$ 15.03	140.76 $\pm$ 53.39*
Mean nucleus size ( $\mu\text{m}$ )	6.10 $\pm$ 1.23	6.45 $\pm$ 1.08	7.38 $\pm$ 0.85	8.68 $\pm$ 1.48*
Dispersion of nucleus size	32.27 $\pm$ 13.28	43.90 $\pm$ 20.61	31.99 $\pm$ 11.23	47.83 $\pm$ 21.11*
Mean nucleus/cell ratio	0.39 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.13	0.42 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.10
Dispersion of nucleus/cell ratio	0.07 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03*
Number of nucleoli	0.99 $\pm$ 0.49	1.24 $\pm$ 0.61	0.39 $\pm$ 0.33	0.50 $\pm$ 0.50
Dispersion of number of nucleoli	0.67 $\pm$ 0.29	0.82 $\pm$ 0.32	0.37 $\pm$ 0.25	0.56 $\pm$ 0.33
Mean nucleolus size ( $\mu\text{m}$ )	1.14 $\pm$ 0.33	1.32 $\pm$ 0.36	1.73 $\pm$ 0.39	2.02 $\pm$ 0.39
Dispersion of nucleolus size	8.63 $\pm$ 4.02	13.38 $\pm$ 6.78*	12.00 $\pm$ 4.70	16.85 $\pm$ 6.99
Mean nucleolus/nucleus ratio	0.18 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.04
Dispersion of nucleolus/nucleus ratio	0.04 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02*	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02

Benignity and malignancy were based on histopathological diagnosis, and only epithelial or mesenchymal tumor (excluding melanoma) were evaluated. \*: Significantly different from the benign measurement.

## 第 2 章

イヌの腫瘍細胞診における迅速免疫染色法の開発：

サイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクの検出



## 緒 言

細胞診は非侵襲的な腫瘍性疾患の診断法であり、獣医学においてもその重要性は高い。一般的に、獣医学細胞診はロマノフスキー染色（ギムザ染色）を用いた細胞形態学的所見に基づいて行われる。しかしながら、細胞の形態から腫瘍細胞の由来を推測することが困難な場合も多い。例えば、未分化癌、未分化肉腫、無顆粒性の悪性黒色腫などは通常の細胞診のみで診断することが難しい。そのような場合には免疫細胞化学 (immunocytochemistry; ICC) が有用であり、ICC は人医学細胞診では必要不可欠な検査技術として確立されている (Skoog and Tani, 2011)。人医学における ICC は、腫瘍細胞の由来の特定だけでなく分子標的薬のマーカーや感染病原体の検出にも用いられている (Skoog and Tani, 2011)。また、術中迅速診断や術前診断にも利用されており (Ersoz et al., 2008; Francz et al., 2011; Ligato et al., 2008; Salem et al., 2002)、ICC は細胞診において欠かすことのできない重要な技術になっている。

獣医学細胞診においても近年 ICC が利用されるようになり (Höinghaus et al., 2007; Höinghaus et al., 2008)、腫瘍性疾患の診断に重要なツールとなりつつある。しかしながら、多くの獣医臨床病理医が ICC の有用性を認識しているにもかかわらず、診断に十分に活用されているとはいえない。現在行われている ICC のプロトコルは組織標本における免疫組織化学に準じたものであるが、その染色工程は煩雑で長時間の作業を要するため臨床現場での有用性は高いとはいえない。

一般的な腫瘍細胞診では、はじめに腫瘍細胞を上皮系、非上皮系（間葉系）、円形細胞の 3 つのカテゴリに分類することが重要である。この分類に ICC を利用するためには、上皮系マーカーとしてサイトケラチン、間葉系マーカーとしてビメンチンを用いるのが一般的である (Przeździecki and Sapierzyński, 2014; Ramos-Vara et al., 2010)。さらには、神経系およびメラノサイトのマーカーとして S-100 タンパクも用いられている (Przeździecki

and Sapierzyński, 2014; Ramos-Vara et al., 2010)。これらのマーカーの検出は腫瘍細胞診における ICC の基本であるが、臨床現場で有用な染色法は報告されておらず、実際の腫瘍細胞診で活用されていないのが現状である。

そこで本章では、イヌの腫瘍組織から得た細胞診標本を用いて以下の実験を行った。実験 1 では、細胞診標本からサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクを検出するための迅速酵素抗体法の開発を行った。次いで実験 2 では、実験 1 で開発した迅速酵素抗体法の臨床的な有用性を検証するため、細胞診標本での迅速法の結果と組織標本での免疫組織化学の結果についてその整合性を比較検討した。さらに実験 3 では、1 枚の細胞診標本からサイトケラチンとビメンチンを同時検出するための方法として蛍光抗体法を応用し、迅速多重蛍光抗体法の開発を行った。そして、開発した多重蛍光抗体法で得られた結果を前述の迅速酵素抗体法の結果と比較、各々の方法の利点と欠点を検証した。

## 材料および方法

本実験は鹿児島大学の動物実験指針に従い実施された（認証番号 VM15040）。

### 実験 1：迅速酵素抗体法の開発

#### 1 - 1. サンプル

鹿児島大学附属動物病院にて外科的に摘出されたイヌの腫瘍組織からスタンプ標本を作製した。標本作製後の腫瘍組織はすべてホルマリンで固定して組織病理学的診断に供された。標本は作製後すぐに風乾し、使用するまで $-30^{\circ}\text{C}$ にて未固定のまま凍結保存した。

サイトケラチンの検出のためには、上皮系腫瘍として乳腺未分化癌（n=2）、甲状腺癌（n=1）、腺扁平上皮癌（n=1）、肛門周囲腺腫（n=1）および移行上皮癌（n=2）のサンプルを用いた。ビメンチンの検出のためには、非上皮系腫瘍として軟骨肉腫（n=1）、骨肉腫（n=1）、血管肉腫（n=1）、線維肉腫（n=1）および粘液肉腫（n=1）のサンプルを用いた。S-100 タンパクの検出のためには、無顆粒性メラノーマ（n=1）および悪性末梢神経鞘腫（n=1）のサンプルを用いた。

#### 1 - 2. 試薬

免疫染色の検出系には、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンビオチン法（labeled streptavidin-biotin system; LSAB, DakoCytomation, Glostrup, Germany）を用いた。一次抗体には、抗ヒトサイトケラチン・マウスモノクローナル抗体（clone AE1/AE3, DakoCytomation）、抗ヒトビメンチン・マウスモノクローナル抗体（clone V9, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA）および抗ヒト S-100 タンパク・ウサギポリクローナル抗体（DakoCytomation）を使用した。二次抗体にはビオチン化抗マウス IgG（H+L）ヤ

ギ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) およびビオチン化抗ウサギ IgG (H+L) ヤギ血清 (Vector Laboratories) を使用した。抗体の希釈には、1%ウシ血清アルブミン (BSA; Fraction V, Sigma-Aldrich, Sr. Louis, MO, USA) を含む 10 mM 生理的リン酸緩衝液 (PBS; pH7.4) を用いた。ブロッッキング液には、3% BSA/PBS を使用した。発色には 3,3'-diaminobenzidine (DAB buffer tablet, Merck, Darmstadt, Germany) を使用した。核染色はマイヤーのヘマトキシリン液で行った。陰性コントロール試験のためには、一次抗体の代わりに正常マウス IgG (DakoCytomation) および正常ウサギ IgG (RandD Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用した。

### 1 - 3. 固定液の決定

アセトン (4°C、1 分間)、10%中性緩衝ホルマリン (NBF; 室温、15 分間) および 95% エタノール (室温、15 分間) の 3 種類の固定液について検討を行った。これらの条件検討は以下に示す従来法の酵素抗体法のプロトコルに従って行った。

- 1) ドライヤーにより風乾 (冷風)
- 2) 固定
- 3) 蒸留水で洗浄
- 4) 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化 (30 分間)
- 5) PBS で洗浄
- 6) 3% BSA/PBS によるブロッッキング (室温、60 分間)
- 7) 一次抗体でインキュベート : サイトケラチンとビメンチンは 400 倍希釈、S-100 タンパクは 200 倍希釈 (すべて 4°C、一晚)
- 8) PBS で洗浄
- 9) 二次抗体でインキュベート (200 倍希釈、室温、30 分間)

- 10) PBS で洗浄
- 11) LSAB でインキュベート (ready-to-use、室温、15 分間)
- 12) PBS で洗浄
- 13) DAB による発色 (1ml につき 3  $\mu$ l の 3%過酸化水素水を混和、室温、5 分間)
- 14) 冷却蒸留水による反応停止
- 15) マイヤーのヘマトキシリンで核染色
- 16) 水洗
- 17) 乾燥
- 18) キシレンで透徹
- 19) 封入

#### 1-4. 迅速酵素抗体法のプロトコルの確立

各々のマーカーの検出に最適な固定液の選定後、各抗体および試薬の反応時間の短縮化と染色工程の簡略化を試みた。下記に示す各抗体と LSAB のインキュベートは 37°C のオーブン内で行った。はじめに各抗体の反応時間を 5 分間に設定し、一次抗体の希釈倍率を検討した。サイトケラチンおよびビメンチンは 10、20、50、100 および 200 倍希釈で比較し、S-100 タンパクは 100、200 および 400 倍希釈で比較した。次いで、二次抗体についても反応時間を 5 分間に設定し、150、450、750 倍希釈で比較検討した。最適希釈倍率の抗体を用いたシグナルが通常の酵素抗体法により検出されたシグナルよりも弱い場合には、反応時間を 10 および 15 分間に延長した。LSAB は ready-to-use の希釈液をそのまま使用し、反応時間を 5、10 および 15 分間で比較検討した。さらに、通常の酵素抗体法における過酸化水素処理の工程を省略し、ブロッキング時間を 5—10 分間に短縮することで、プロトコルの簡略化を試みた。PBS による洗浄は、洗浄ビンから約 10 秒間の直接噴射に簡略化した。

## 実験 2 : 迅速酵素抗体法の臨床的有用性の検討

### 2-1. サンプル

鹿児島大学附属動物病院にて外科的に摘出されたイヌの腫瘍組織 (n=30) からスタンプ標本を作製した。上皮系腫瘍として、乳腺腫、乳腺未分化癌、甲状腺腫、直腸腺癌、肺腺癌、肺の扁平上皮癌、睪島細胞癌、副腎皮質腺腫、前肢皮下の悪性上皮系腫瘍、肝細胞腺腫を肝細胞癌、耳介の皮脂腺腫、肛門周囲腺腫、肛門嚢腺癌および腎細胞癌を用いた (肝細胞癌のみ 2 例、その他はすべて各 1 例)。非上皮系腫瘍として、肝臓の血管肉腫、脾臓の血管肉腫、脾臓の組織球肉腫、骨盤腔内の肉腫、皮下の軟部組織肉腫、前肢の悪性末梢神経鞘腫、陰嚢の肥満細胞腫、精巣の間細胞腫、肛門の肥満細胞腫、肥満細胞腫のリンパ節転移病変、肉腫のリンパ節転移病変、胸腔内の組織球肉腫、腹腔内の組織球肉腫および縦隔の形質細胞腫を用いた (各 1 例)。

スタンプ標本は作製後すぐに風乾し、使用するまで $-30^{\circ}\text{C}$ にて未固定のまま凍結保存した。スタンプ標本の作製に用いた腫瘍組織はホルマリンで固定し、組織病理学的診断に使用した。細胞診と組織病理学的診断は互いの診断に影響がないように別々に実施された。なお、複数種類の腫瘍細胞が認められた症例は本実験から除外された。

### 2-2. 試薬

免疫染色は細胞診標本および組織標本のいずれにおいても LSAB (ready-to-use; KPL, Gaithersburg, MD, USA) 法を用いて行った。一次抗体には、抗ヒトサイトケラチン・マウスモノクローナル抗体 (clone AE1/AE3; DakoCytomation) および抗ヒトビメンチン・マウスモノクローナル抗体 (clone V9; Thermo Fisher Scientific) を使用した。二次抗体には、ビオチン化抗マウス IgG (H+L) ヤギ血清 (Vector Laboratories) を使用した。抗サイトケラチン抗体 (ready-to-use) を除くすべての抗体は 0.25%カゼイン (Sigma-Aldrich) を含

む 10 mM PBS により希釈した。0.25%カゼイン/PBS 溶液はブロッキング液としても使用した。発色には DAB を使用した (DAB buffer tablet, Merck)。核染色にはカラッチのヘマトキシリン (Muto Pure Chemical, Tokyo, Japan) を使用した。陰性コントロール試験には、一次抗体の代わりに正常マウス IgG (DakoCytomation) を使用した。陽性あるいは陰性対照の細胞としては、同一標本上の非腫瘍性の上皮細胞やマクロファージおよび線維芽細胞などの非上皮系細胞の染色性を確認した。同一標本上にこれらの細胞が含まれない場合には、当研究室にて凍結保存されている標本から組織病理学的に上皮系あるいは非上皮系腫瘍と診断されているものを選択して使用した。

### 2 - 3. 迅速酵素抗体法

細胞診標本を用いた迅速酵素抗体法のプロトコルは以下の通りである。

- 1) ドライヤーにより風乾 (冷風)
- 2) アセトン固定 (4°C、1 分間)
- 3) PBS で洗浄 (洗浄ボトルによる直接噴射、10 秒間)
- 4) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング (室温、10 分間)
- 5) 一次抗体でインキュベート (100 倍希釈、37°C、10 分間)
- 6) PBS で洗浄 (約 10 秒)
- 7) 二次抗体でインキュベート (200 倍希釈、37°C、10 分間)
- 8) PBS で洗浄 (約 10 秒)
- 9) LSAB でインキュベート (ready to use、37°C、10 分間)
- 10) PBS で洗浄 (約 10 秒)
- 11) DAB による発色 (1ml につき 3  $\mu$ l の 3%過酸化水素水を混和、室温、5 分間)
- 12) 冷却蒸留水による反応停止

- 13) カラッチのヘマトキシリンで核染色
- 14) 水洗
- 15) 乾燥
- 16) キシレンで透徹
- 17) 封入

#### 2 - 4. 免疫組織化学

組織標本における免疫組織化学のプロトコルは以下の通りである。

- 1) 脱パラフィンおよび再水和
- 2) マイクロウェーブ熱処理による抗原賦活化処理：抗原賦活化液には 10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いた。マイクロウェーブ照射 (750W) には家庭用電子レンジ (NE-5350F; National, Osaka, Japan) を使用した。予加熱 5 分間で緩衝液を沸騰させ、スライドグラスを投入してマイクロウェーブ照射を 10 分間行った。照射後は室温で 20 分間静置した。
- 3) 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化 (室温、30 分間)
- 4) PBS で洗浄 (5 分間×3 回)
- 5) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング (室温、60 分間)
- 6) 一次抗体でインキュベート (200 倍希釈、室温、20 分間)
- 7) PBS で洗浄 (5 分間×3 回)
- 8) 二次抗体でインキュベート (200 倍希釈、室温、30 分間)
- 9) PBS で洗浄 (5 分間×3 回)
- 10) LSAB でインキュベート (ready to use、室温、30 分間)
- 11) PBS で洗浄 (5 分間×3 回)



- 12) DAB による発色 (1ml につき 3  $\mu$ l の 3%過酸化水素水を混和、室温、5 分間)
- 13) 冷却蒸留水による反応停止
- 14) マイヤーのヘマトキシリンで核染色
- 15) 水洗
- 16) アルコール系列で脱水
- 17) キシレンで透徹
- 18) 封入

## 2-5. 評価と統計解析

細胞診迅速免疫染色および組織標本の免疫染色を行った標本を一般的な明視野光学顕微鏡で観察し、腫瘍細胞のシグナルを陽性 (+) あるいは陰性 (-) に分類した。シグナルの強さは陰性対照の細胞と比較した。陰性対照の細胞に明らかなシグナルが検出された場合には、非特異反応であると判断した。細胞診迅速免疫染色および組織標本のシグナルの一致性は  $\kappa$  係数により統計学的に評価した。統計学的解析には、PASW software program for Windows (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA) を使用した。

## **実験 3 : 迅速多重蛍光抗体法の開発とその臨床的有用性の検証**

### 3-1. サンプル

鹿児島大学附属動物病院にて外科的に摘出されたイヌの腫瘍組織 (n=9) から作製したスタンプ標本および胸水の沈渣塗抹標本 (n=5) を用いた。腫瘍組織の内訳は、精巣の間細胞腫 (n=1)、精巣の精上皮腫 (n=2)、精巣のセルトリ細胞腫 (n=1)、悪性上皮系腫瘍のリンパ節転移 (n=2)、前肢皮下のアポクリン腺癌 (n=1)、鼻腔内の悪性上皮系腫瘍 (n=1) および背部皮下の脂肪肉腫 (n=1) である。胸水の沈渣塗抹標本は、悪性中皮腫 (n=2)、悪性上

皮系腫瘍 (n=2) および癌腫 (n=1) から作製された。いずれの細胞診標本も作製後すぐに風乾し、使用するまで $-30^{\circ}\text{C}$ にて未固定のまま凍結保存した。スタンプ標本の作製に用いた腫瘍組織はホルマリンで固定し、組織病理学的診断に使用した。

### 3-2. 試薬

多重蛍光抗体法は蛍光標識二次抗体を用いた間接法により行った。一次抗体には、抗ヒトサイトケラチン・マウスモノクローナル抗体 (clone AE1/AE3, ready-to-use; DakoCytomation) および抗ヒトビメンチン・ウサギモノクローナル抗体 (clone SP20, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) を使用した。二次抗体には、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 血清 (Life Technologies, Paisley, UK) および Alexa 594 標識ロバ抗ウサギ IgG (H+L) 血清 (Life Technologies) を使用した。抗体は 0.25%カゼインを含む 10 mM PBS により希釈した。0.25%カゼイン/PBS 溶液はブロッキング液としても使用した。核染色には 4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Dojinkagaku, Tokyo, Japan) を使用した。陰性コントロール試験には一次抗体の代わりにブロッキング液を使用した。

### 3-3. 迅速多重蛍光抗体法

迅速多重蛍光抗体法は、前述の迅速酵素抗体法のプロトコルを改変して作製した。以下の通りである。

- 1) ドライヤーにより風乾 (冷風)
- 2) アセトン固定 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、1 分間)
- 3) PBS で洗浄 (洗浄ボトルによる直接噴射、10 秒間)
- 4) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング (室温、5-10 分間)
- 5) 一次抗体の混合液インキュベート: 抗ビメンチン抗体を抗サイトケラチン抗体液 (ready

to use) で 200 倍希釈 (37°C、15 分間)

- 6) PBS で洗浄 (10 秒間)
- 7) 二次抗体と DAPI の混合液でインキュベート : 抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体  
および DAPI を各々 500 倍で混合希釈 (37°C、遮光、15 分間)
- 8) PBS で洗浄 (10 秒間)
- 9) 封入 (Fuluoro Mount Plus, Diagnostic Biosystems, Delhi, India)

#### 3-4. 迅速多重蛍光抗体法の評価

染色した標本は蛍光顕微鏡 (BX-53; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。腫瘍細胞のシグナルを陽性 (+) あるいは陰性 (-) を鑑別し、上記の実験 2 で示した迅速酵素抗体法における染色結果と比較した。

#### 3-5. 蛍光検出後のギムザ染色

蛍光顕微鏡による観察後の細胞診標本は、PBS に浸漬してカバーガラスを外して封入剤を洗浄した後にギムザ染色 (メイグリユンワド・ギムザ染色) を施した。

## 結 果

### 実験 1

#### 固定液の選定

3 種類の固定液について、シグナル強度および背景染色の強さを表 2-1 に示した。サイトケラチンはすべての固定液で明瞭で強いシグナルが認められ (図 2-1 A-C)、ビメンチンはアセトン固定で強いシグナルが認められた (図 2-1 D-F)。S-100 タンパクはすべての固定液で中等度のシグナルが認められた (図 2-1 G-I)。背景の染色性はサイトケラチン、ビメンチン、S-100 すべての検出においてアセトン固定がその他の固定液と比較して弱かった。

#### 各抗体の希釈倍率と反応時間の決定

以降の条件検討はすべてアセトン固定標本を用いて実施した。抗ヒトサイトケラチン抗体および抗ヒトビメンチン抗体は、反応時間を 5 分間に設定し、それぞれ 10、20、50、100 および 200 倍希釈で検討した。その結果、サイトケラチンは 50 倍希釈、ビメンチンは 100 倍希釈で十分な強度のシグナルが検出された。抗 S-100 タンパク抗体は、100、200 および 400 倍希釈でシグナル強度を比較した。反応時間は 5、10 および 15 分間で検討した。その結果、S-100 タンパクは 100 倍希釈で 10 分間のインキュベーションで十分な強度のシグナルが検出された。

二次抗体についても、一次抗体の条件検討と同様に反応時間を 5 分間に設定し、150、450 および 750 倍希釈で検討した。その結果、二次抗体は 150 倍希釈で十分な強度のシグナルが検出された。LSAB は、reasy-to-use の試薬でも 5 分間のインキュベーションで十分な強度のシグナルが検出された。上記の結果より、各抗体および試薬の最適な反応条件は次のように決定した。抗サイトケラチン：50 倍希釈で 5 分間 (37°C)、抗ビメンチン：100 倍希釈で 5 分間 (37°C)、抗 S-100 タンパク：100 倍希釈で 10 分間 (37°C)、二次抗体：150 倍希

積で 5 分間 (37°C)、LSAB : ready-to-use で 5 分間 (37°C)。

### 染色工程の簡略化

酵素抗体法を用いた通常の免疫染色プロトコルから、過酸化水素処理工程の省略、ブロッキング時間の短縮化および PBS 洗浄の簡便化を行った。その結果、各々の工程の省略あるいは簡便化による非特異反応や背景染色の増強は認められなかった。過酸化水素処理については、むしろ省略した方が細胞の脱落がなく細胞形態の保存も良好であった。

### 迅速酵素抗体法の確立

上記の検討によって確立した迅速酵素抗体法のプロトコルを表 2-2 に示した。このプロトコルにより約 60 分でサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクを検出することができ、それぞれのマーカーに対するシグナル強度と特異性は通常の酵素抗体法と比較して同等であった (図 2-2)。また、迅速法における細胞形態の保持性は通常的手法よりも高く、細胞の脱落は少なかった。

## 実験 2

### 迅速酵素抗体法の臨床例への応用

実験 1 で確立した迅速酵素抗体法を 30 例のイヌの腫瘍細胞診標本に応用した。その結果、5 例 (16.7%) では非特異反応が認められたが、25 例 (83.3%) では明瞭な陽性シグナルが腫瘍細胞に検出された。組織病理検査の結果、25 例の内訳は上皮系腫瘍が 13 例、非上皮系腫瘍が 12 例であった (表 2-3)。

組織病理検査で上皮系腫瘍と分類された 13 例中 11 例 (84.6%) は、本法による細胞診免疫染色で腫瘍細胞がサイトケラチン陽性かつビメンチン陰性を示した (図 2-4)。13 例中 2 例は上皮系腫瘍でも腫瘍細胞にサイトケラチンの陽性シグナルが検出されなかった。この

2例は組織病理診断では肝細胞腺腫と皮下の悪性上皮系腫瘍であった。肝細胞腺腫は組織標本の免疫染色でも腫瘍細胞はサイトケラチンに陰性であり、細胞診の迅速酵素抗体法の結果と一致していた(図 2-4 AandB)。一方、皮下の悪性上皮系腫瘍では細胞診標本と組織標本の結果が一致しなかった。すなわち、細胞診の迅速酵素抗体法では腫瘍細胞はサイトケラチンに陰性であったが、組織標本の免疫染色ではサイトケラチン陽性の腫瘍細胞と陰性の腫瘍細胞が混在していた(図 2-4 CandD)。ビメンチンの免疫染色では、細胞診標本、組織標本ともに陽性の腫瘍細胞と陰性の腫瘍細胞が混在していることが確認された(図 2-4 EandF)。

組織病理検査で非上皮系腫瘍と分類された 12 例は、6 例が間葉系腫瘍、6 例が円形細胞腫瘍であった(表 2-4)。細胞診の迅速酵素抗体法では、12 例すべてで腫瘍細胞はビメンチン陽性かつサイトケラチン陰性を示した(図 2-5)。組織標本での免疫染色の結果も同様であり、12 例すべての症例で腫瘍細胞はビメンチン陽性かつサイトケラチン陰性を示した。

### 統計学的解析

実験 2 で使用したすべての腫瘍組織 (n=30) について、細胞診での迅速酵素抗体法と組織標本での免疫染色で得られた結果の一致性を統計学的に解析した。その結果、上皮系腫瘍では細胞診標本と組織標本の一致性は中等度であり、 $\kappa$  係数はサイトケラチンで 0.236、ビメンチンで 0.294 であった。一方、非上皮系腫瘍では細胞診標本と組織標本の結果はほぼ一致しており、 $\kappa$  係数はサイトケラチン、ビメンチンともに 0.857 と高い値を示した。

## 実験 3

### サイトケラチンとビメンチンの同時検出のための迅速多重蛍光抗体法の確立

実験 2 確立した迅速染色法をもとにして、1 枚の細胞診標本からサイトケラチンとビメンチンを同時検出する迅速多重蛍光抗体法を開発した。本法は約 45 分で染色を完了すること

ができ、サイトケラチン陽性シグナルと赤色蛍光を示すビメンチン陽性シグナルを同意標本状で検出することができ、非特異反応やバックグラウンドもほとんど認められなかった（図 2-6）。

#### 迅速多重蛍光抗体法と迅速酵素抗体法の比較

迅速多重蛍光抗体法で得られたシグナルを実験 2 で開発した迅速酵素抗体法と比較し、その結果をを表 2-5 に示した。

迅速多重蛍光抗体法では、本実験に用いたイヌの臨床細胞診標本 14 例すべてで上皮系腫瘍細胞はサイトケラチン陽性かつビメンチン陰性、非上皮系腫瘍はビメンチン陽性かつサイトケラチン陰性を示し、組織病理学的に診断された腫瘍の分類と合致していた。一方、迅速酵素抗体法では、14 例中 10 例において特異性の高いシグナルが検出され、それらは組織病理学的診断と合致する結果が得られた。しかしながら、14 例中 3 例では非特異反応が強く認められ、迅速酵素抗体法で腫瘍細胞の由来を鑑別することができなかった。このうち 2 例は精巣の間細胞腫と精上皮腫であり、迅速酵素抗体法では腫瘍細胞はビメンチン陽性を示したが、サイトケラチンの検出では強い背景染色が認められ陰性を確認できなかった。残りの 1 例は脂肪肉腫であるが、酵素抗体法によりサイトケラチン、ビメンチンの両マーカーとも著しい背景染色が認められ、特異的なシグナルを検出できなかった。迅速多重蛍光抗体法では、酵素抗体法によって背景染色が強かったこれらの 3 例においても、ビメンチン陽性の赤色蛍光のみが特異的に検出され、背景染色は認められなかった（図 2-7）。

胸水の沈渣塗抹標本、リンパ節の針生検標本および精巣腫瘍のスタンプ標本では、迅速多重蛍光抗体法の優位性が際立っていた。悪性上皮系腫瘍と診断された症例の胸水の沈渣塗抹標本では、1 枚の標本から緑色蛍光を呈するサイトケラチン陽性の上皮系腫瘍細胞、赤色蛍光を呈するビメンチン陽性の非上皮系細胞（マクロファージ）が明瞭に鑑別できた。さらに、両マーカーに対する 2 枚のデジタル画像をマージすると、サイトケラチンとビメンチ

ンの共発現を示す黄色蛍光を呈する中皮細胞の鑑別が容易であった（図 2-8）。悪性上皮系腫瘍のリンパ節転移と診断された症例のリンパ節針生検標本では、赤色のビメンチン陽性を示す多数のリンパ球に混じり緑色のサイトケラチン陽性の腫瘍細胞が存在することが確認された（図 2-9）。精巣のセルトリ細胞腫と診断された症例では、赤色のビメンチン陽性の非上皮系細胞が観察され、これに緑色のサイトケラチン陽性の上皮系細胞が少数混在することが確認された（図 2-10）。

#### 迅速多重蛍光抗体法後のギムザ染色

迅速多重蛍光抗体法を行った後の細胞診標本にギムザ染色を施した。その結果、通常のギムザ染色標本と比較すると細胞質がやや淡染かつ核が濃染される傾向が認められるものの、細胞形態の観察に十分な染色性を得ることができた（図 2-11）。一方、ギムザ染色を行った後の細胞診標本に迅速多重蛍光抗体法を施しても特異的な陽性シグナルは検出できなかった。



## 考 察

免疫染色は抗原抗体反応を応用した特定の分子の検出法であり、近年の病理診断には必須の診断技術として広く活用されている。しかしながら、一般的な免疫染色のプロトコルは作業工程が多いため結果が得られるまでに長時間を要し、診断の迅速性が求められる細胞診では有用性が低い。人医学細胞診では、迅速に免疫染色を行う方法として高濃度の抗体を短時間で反応させる迅速法が術中診断で活用されており、上皮系細胞マーカーであるサイトケラチンや悪性リンパ腫のマーカーである CD45 などで報告がある(Francz et al., 2011; Maeda et al., 2005)。しかしながら、高濃度の抗体を用いる迅速免疫染色は非特異反応の発生リスクが否めず、確定診断を目的とする細胞診に応用することは難しい。そこで本章では、より実用的な細胞診免疫染色法として、可能な限り染色工程を簡略化することで迅速性を高めた汎用性の高い染色法を確立し、その臨床的有用性を検証した。

本章では、実験 1 として一般的な酵素抗体法を用いた迅速免疫染色法の開発を試みた。より信頼性の高い方法を確立するために基礎的な条件設定から検討を始め、まず標本の固定法を検討した。検討を行った固定法のうち、アセトン固定の有用性はヒトのリンパ節細胞診において報告されている(Salem et al., 2002)。また、イヌでも非上皮系腫瘍についてアセトン固定標本からビメンチン、S-100 タンパクおよびメラニン-A の検出した報告がある(Höinghaus et al., 2008; Przeździecki et al., 2015)。本章では、アセトンだけでなく組織標本の免疫染色で一般的に用いられる中性緩衝ホルマリンとヒトの細胞診標本の免疫染色で用いられる 95%エタノールについて検討を行った。その結果、獣医学領域で一般的な乾燥させた細胞診標本の免疫染色では、サイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクののすべてでアセトン固定が最適であることが明らかになった。細胞診の免疫染色におけるアセトン固定の不利な点として、脂肪分の多い組織が固定されにくいことや染色中に標本上の細胞の脱落が挙げられるが(Igor and Werner, 2010; Valli et al., 2009)。今回の検索

ではアセトン固定における細胞脱落の問題は認められなかった。ホルマリンおよびエタノールによる固定もサイトケラチンと S-100 タンパクの検出は可能であったが、ビメンチンの検出には不適であった。ホルマリン固定は乾燥細胞診標本の免疫染色でも有用であることが報告されており (Valli et al., 2009)、エタノールは人医の細胞診において一般的な固定液であるが (Maeda et al., 2005; Shidham et al., 2000)、今回の検索ではサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクの検出においてアセトンより優位な点は認められなかった。

一般的な組織標本の免疫染色では、熱処理による抗原賦活化処理が必要なことが多く、特にホルマリン固定では抗原賦活化処理の有用性は高い (Igor B and Werner, 2010)。一方、エタノール固定が主流の人医の細胞診では免疫染色における有用性は低い (Valli et al., 2009)。これは今回の検索で最適とされたアセトン固定でも同様であり、サイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクのすべてでその検出に抗原賦活化処理は不要であった。乾燥細胞診標本の免疫染色でアセトン固定を選択することは、染色時間の短縮だけでなく熱処理による細胞の損傷や脱落も回避できる意味においても重要であると考えられる。

免疫染色プロトコルの簡略化のためには、各抗体および試薬に対する反応時間の短縮も重要である。今回はサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクの迅速酵素抗体法の開発にあたり、抗体の反応時間を 5 分間 (37°C) に固定して抗体濃度の検討を行った。この反応時間と反応温度は過去のヒトのリンパ節標本における免疫染色の報告をもとに決定したものである (Salem et al., 2002)。この反応条件で検討を行った結果、抗サイトケラチン抗体は、抗体の製造社の推奨使用濃度である 50 倍希釈 (3.6 µg/ml) で十分な強度のシグナルが検出された。抗ビメンチン抗体は、200 倍希釈 (2.0 µg/ml) で十分な強度のシグナルが検出され、これは抗体製造社の推奨使用濃度範囲 (50—100 倍希釈 ; 2.0—4.0 µg/ml) の最低濃度と一致していた。一方、抗 S-100 タンパク抗体は、高濃度の抗体を反応させる必要があり、抗体製造社の推奨使用濃度 (400 倍希釈 ; 2.56 µg/ml) の 4 倍にあたる 100 倍

希釈 (10.25 µg/ml) が適当であった。また、十分な強度のシグナルを検出するためには反応時間を 10 分間に延長する必要がある。二次抗体では、抗マウス IgG と抗ラビット IgG とともに最適濃度は抗体製造社の推奨使用濃度範囲 (150—750 倍希釈 ; 2.0—10.0 µg/ml) の最高濃度である 150 倍希釈 (10.0 µg/ml) で十分な強度のシグナルが検出できた。さらに、ready-to-use の標識ストレプトアビジン液においても 5 分間 (37°C) の反応条件でも十分な強度のシグナルを検出できることも明らかになった。抗 S-100 タンパク抗体を除いたすべての抗体および標識ストレプトアビジン液において、5 分間かつ通常の使用濃度で反応を終了できることは実践的な迅速免疫染色法の開発には大きな強みであった。

過酸化水素処理は、非特異反応の原因となる内因性ペルオキシダーゼを除去する工程であり、DAB 発色による一般的な酵素抗体法では必須の操作とされている (Igor B and Werner, 2010)。しかしながら、ヒトの術中細胞診のように迅速性が優先される場合には、過酸化水素処理はしばしば省略されることがある (Katayama et al., 2004)。今回の迅速酵素抗体法の開発でも過酸化水素処理の省略を試みたが、省略にともなう非特異反応の増強は認められず、染色プロトコルをさらに簡略化することができた。しかしながら、マクロファージや肝細胞など内因性ペルオキシダーゼが豊富な細胞をターゲットとする細胞診標本では、検出されたシグナルを正確に解釈するために過酸化水素処理を必要とする可能性がある。その際には過酸化水素による細胞の剥離を回避するために通常よりも低濃度の過酸化水素を使用する必要があるだろう (Key, 2006)。

本章の実験 1 では、上記のような工夫により実用性の高い迅速酵素抗体法を開発することができ、約 60 分という短時間で乾燥細胞診標本からサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクを検出することが可能となった。本法には特別な試薬や設備の必要性がないため一般的な実験室で実施可能であり、イヌの腫瘍診断の臨床病理学的検査法としての有用性が期待される。しかしながら、臨床現場において本法を活用するためには、その診断精度だけでなく本法の応用が妥当あるいは不適なケースを明らかにしておく必要がある。そ

ここで実験 2 では、イヌの腫瘍組織 30 例について開発した迅速酵素抗体法を用いてサイトケラチンとビメンチンの検出を行い、その結果を通常の組織標本の免疫染色の結果と比較した。診断精度は  $\kappa$  係数による一致性で解析し、今回開発した細胞診迅速酵素抗体法は上皮系腫瘍よりも非上皮系腫瘍の診断に有用性が高いことが明らかになった。上皮系腫瘍の  $\kappa$  係数も決して低くないが、適応症例によっては組織標本の免疫染色の結果と隔たりが認められた。

上皮系腫瘍は未分化であるほど核/細胞質 (N/C) 比は高く、細胞間接着性が弱くなるため、細胞の外形は円形に近づく。そのため、悪性の上皮系腫瘍と円形細胞腫瘍あるいは悪性の非上皮系腫瘍との間の形態学的特徴は類似し、特に細胞診では腫瘍細胞の系統を鑑別することが困難になる。上皮系腫瘍細胞はサイトケラチン陽性かつビメンチン陰性を示すため、上記のように細胞形態から腫瘍細胞の由来の鑑別が困難な場合に免疫染色の有用性が高いと考えられる。実際に、上皮系腫瘍 13 例のうち 11 例 (85%) で腫瘍細胞はサイトケラチン陽性、ビメンチン陰性を示し、開発した迅速酵素抗体法の有用性の高さが示された。一方、13 例中 2 例では上皮系腫瘍と診断されなかったことも事実であり、本法における染色結果の解釈には注意を払う必要がある。この診断できなかった症例のうち、肝細胞腺腫の症例では細胞診の迅速酵素抗体法と組織標本の免疫組織化学による結果は一致していたが、ともに腫瘍細胞はサイトケラチンに陰性であった。その原因として、今回用いた抗体が検出できるサイトケラチンのサブタイプと、腫瘍細胞が発現するサイトケラチンのサブタイプに相違があったことが考えられる。本研究で使用した抗サイトケラチン抗体のクローンは AE1/AE3 (汎サイトケラチン) であり、サイトケラチン 1-8、10、13-16 および 19 を認識する。肝細胞腫瘍は様々なサイトケラチンを発現し (Van et al., 1990; Van et al., 1988)、肝細胞腺腫はサイトケラチン 8 と 18 を発現することが知られている (Ramos-Vara et al., 2001)。今回用いた抗体で検出できるサブタイプと合致するのはサイトケラチン 8 のみであり、そのため陽性シグナルが微弱で検出できなかったと推察される。皮下の悪性上皮系腫瘍

であり、細胞診標本における腫瘍細胞はサイトケラチン陰性であった。一方、組織標本においてはサイトケラチンに陽性と陰性を示す細胞が混在していた。上皮系腫瘍であるにもかかわらずサイトケラチン陰性を示した理由として、上皮系腫瘍の転移機構である上皮間葉転換の関与が考えられる。上皮間葉転換は腫瘍細胞が崩壊することで始まり(Yoshida et al., 2014)、崩壊した上皮細胞は次第にサイトケラチンの代わりにビメンチンを発現して間葉系の特徴を持つようになる。(Cervantes-Arias et al., 2013)。今回、細胞診および組織標本の免疫染色でサイトケラチン陰性を示した腫瘍細胞には上皮間葉転換が起きていた可能性がある。実際に、この皮下腫瘍は組織病理学的には腎細胞癌の転移病変であると示唆されている。このように上皮系腫瘍ではすべての腫瘍細胞を汎サイトケラチン(AE1/AE3)抗体で識別できないため、腫瘍細胞がサイトケラチン陰性を示したとしても安易に上皮系腫瘍を否定するべきではないと考えられた。

間葉系腫瘍は一般的にビメンチン陽性かつサイトケラチン陰性を示す。今回の検索では、間葉系腫瘍における細胞迅速酵素抗体法の診断は組織標本の診断と100%一致していた。間葉系腫瘍は、上皮系腫瘍とは異なり、転移の課程でビメンチンの発現が消失することはないため、細胞迅速酵素抗体法での診断精度が高くなったと考えられる。しかしながら、上皮系腫瘍でも上皮間葉転換を起こすとビメンチンの発現が認められるため、ビメンチン陽性の腫瘍細胞でも常に悪性の上皮系腫瘍の可能性を考慮する必要がある。

このように、今回開発した迅速酵素抗体法は腫瘍細胞診の補助診断法として臨床的有用性が高いことが明らかになった。しかしながら、本法では一枚の標本から一つのマーカーしか検出できないため、陽性シグナルを示した細胞が真に腫瘍細胞であるかの判別が難しいことも経験された。そこで実験3では一枚の標本からサイトケラチンとビメンチンを同時検出する細胞診多重蛍光抗体法の開発に取り組んだ。多重蛍光抗体法では、異なる動物種で作製した一次抗体を組み合わせることによって複数のマーカーを同時に検出することができる。しかしながら、これまで既述してきた迅速酵素抗体法では抗サイトケラチン抗体と抗

ビメンチン抗体はともにマウスで作製したモノクローナルであり、そのままでは多重蛍光抗体法に利用できない。そこで、実験 3 では抗ビメンチン抗体をウサギで作製したモノクローナル抗体に変更することでサイトケラチンとビメンチンの同時検出を可能にした。予備実験の結果、この抗ビメンチン・ウサギモノクローナル抗体は高感度であることがわかり、すでに開発した迅速酵素抗体法の染色手技を応用することで約 45 分と短時間で実施できる迅速多重蛍光抗体法を作製することができた。本法を用いて観察を行うと、一枚の細胞診標本からサイトケラチン陽性を示す緑色蛍光の細胞とビメンチン陽性を示す赤色蛍光の細胞を同時に観察することができ、上皮系細胞と非上皮系細胞の鑑別がより簡便になった。

この迅速多重蛍光抗体法を臨床サンプルに適用すると、その高い有用性を証明することができた。例えば、悪性上皮系腫瘍のリンパ節転移を呈した症例では、リンパ節の細胞診標本のなかに緑色蛍光を示す上皮系腫瘍細胞が多数含まれていることが一目瞭然であった。腫瘍性疾患の動物でリンパ節腫大が認められる場合には、転移性と反応性過形成との鑑別が非常に重要である。通常、反応性リンパ節やリンパ節炎において上皮系細胞数の増加が認められることはなく、上皮系腫瘍をもつ症例でリンパ節腫大が認められる場合には特に本法の有用性は高いと考えられた。また、精巣のセルトリ細胞腫の症例では、迅速多重蛍光抗体法を適用することで多数のビメンチン陽性の非上皮系細胞以外にも少数のサイトケラチン陽性の上皮系細胞が混在していることが容易に判別できた。イヌの精巣腫瘍は、精上皮細胞、セルトリ細胞あるいは間細胞を由来とするが、しばしば 2 種類の腫瘍細胞に由来することがある(Nabity, 2014)。一般的な細胞診では複数系統の腫瘍細胞が混在するとどの系統の腫瘍細胞が優位であるのか鑑別することは難しいが、迅速多重蛍光抗体法はその鑑別に強い力を発揮すると考えられる。

今回の迅速多重蛍光抗体法のもう一つの利点として、デジタル画像のマージ(合成)がある。これにより、通常の酵素抗体法では難しいサイトケラチンとビメンチンの共発現を黄色蛍光のシグナルとして検出することが可能である。サイトケラチンとビメンチンの両分子を

共発現する細胞としては中皮細胞が代表的である(Barger, 2014; Gumber et al., 2011)。中皮細胞は体腔内で各臓器の表面を覆っているシート状の細胞であるが、種々の刺激により活性化した反応性中皮細胞は腫瘍性でないにもかかわらず細胞診で悪性所見を示すことが多い。また、悪性中皮腫における腫瘍性中皮細胞と腺癌など悪性の上皮系腫瘍細胞は、その細胞形態が酷似するため一般的な細胞診で両者を鑑別することは難しい(Thompson and Rebar, 2016)。さらに、体腔内貯留液には活性化したマクロファージや類上皮化したマクロファージも混在し、これも通常の細胞診で腫瘍細胞の鑑別が困難な原因の一つである。そのため、サイトケラチン陽性細胞、ビメンチン陽性細胞および両者の共発現細胞を同時に観察できる本法は、体腔内貯留液の細胞診への有用性が高いと考えられる。実際に、胸水の沈渣塗抹標本に本法を適用すると、上皮系細胞、非上皮系細胞（主にマクロファージ）、中皮細胞を簡便かつ容易に鑑別することが証明された。

これまで論説してきたように、細胞診における免疫染色は酵素抗体法、蛍光抗体法を問わず細胞の由来の鑑別に強い力を発揮するが、通常の細胞形態を観察できないという欠点がある。例えば、ギムザ染色で悪性の間葉系腫瘍が疑われた場合、たとえ免疫染色でビメンチン陽性細胞が観察されてもそれが腫瘍細胞なのかマクロファージなのかを鑑別することはできない。このような場合、同一の標本に免疫染色とギムザ染色を施すことができればより確実な診断が可能になる。理想的なのはギムザ染色の後に免疫染色を施すことであるが、これは迅速酵素抗体法、迅速多重蛍光抗体法のいずれにおいても不可能であった。しかしながら、迅速多重蛍光抗体法の後にギムザ染色を施すと、やや染色の質が低下するものの一般的な細胞形態の観察には十分なギムザ染色標本を作製することが可能であった。これは今回開発した迅速多重蛍光抗体法の特筆すべき利点の一つである。特に腫瘍細胞と炎症細胞が混在する標本、腫瘍細胞の脱落数が少ない標本、あるいは複数種類の腫瘍細胞が混在する標本では、免疫染色に行うギムザ染色により腫瘍細胞の鑑別に重要な判断材料が得られると考えられる。

最後に、本章ではサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクを細胞診標本で迅速に検出できる免疫染色法を確立した。近年はイヌやネコでも免疫染色に利用できる診断マーカーが多数存在しており (Ramos-Vara et al., 2010)、本章で開発した迅速酵素抗体法および迅速多重蛍光抗体法はその他のマーカーについても利用できると思われる。しかしながら、安易に同じプロトコルで染色を行うのではなく、固定法など基礎的な条件決定から行う必要がある。また、本章での検索では迅速酵素抗体法と迅速多重蛍光抗体法とでは後者の方に利点が多かったが、一概に迅速多重蛍光抗体法の方が勝っているとはいえない。すなわち、動物の診断施設では組織標本を酵素抗体法で免疫染色している診断施設が多く、そのような施設では迅速酵素抗体法の方が容易に導入できると考えられる。一方、日常的に蛍光抗体法を実施している施設であれば、診断の正確さに勝る迅速多重蛍光抗体法を用いる方が適切であろう。本章で開発した細胞診の迅速免疫染色法は、主観的要素の多い細胞診により明確な診断根拠を与えるものであり、獣医学細胞診の高度化を導く有用な手法になると考えられる。



## 小 括

伴侶動物の腫瘍細胞診は、一般的にギムザ染色標本を用いて行われるが、腫瘍細胞の形態からその由来を特定することが困難な場合も多い。そのような場合、細胞診でもサイトケラチン、ビメンチンあるいは S-100 タンパクといった分子を免疫染色することで精度の高い診断を行うことができる。しかしながら、組織標本で行われている一般的な酵素抗体法の工程は煩雑で長時間を要するため細胞診標本での有用性は低い。そこで本章では、獣医学領域の細胞診でも迅速かつ簡便に免疫染色が実施できる方法を確立し、その臨床的有用性について検証した。初めに標識ストレプトアビジンを用いた迅速酵素抗体法を作製し、次いで蛍光標識二次抗体を用いた迅速多重蛍光抗体法を開発した。

迅速酵素抗体法は、固定法（アセトン、ホルマリンおよびエタノール）や抗体の濃度・反応時間の検討からはじめ、抗原賦活化処理、内因性ペルオキシダーゼの阻害、緩衝液による洗浄法など染色手技の徹底した省略と簡略化を行うことにより確立した。検討の結果、固定法としては、サイトケラチン（マウス・モノクローナル抗体）、ビメンチン（マウス・モノクローナル抗体）および S-100 タンパク（ラビット・ポリクローナル抗体）のいずれの検出においてもアセトン固定が最適であった。次いで、抗体の濃度や反応時間を検討した結果、サイトケラチンとビメンチンの検出では通常の抗体濃度でも 5 分間（37℃）で十分な強度のシグナルが得られることが明らかになった。一方、S-100 タンパクについては抗体濃度を通常の 4 倍まで上げる必要があり、反応時間も 10 分間（37℃）に延長する必要があった。抗原賦活化のための熱処理や内因性ペルオキシダーゼ阻害のための過酸化水素処理は省略が可能であり、細胞の脱落防止などむしろ省略する利点の方が多かった。開発した迅速酵素抗体法を用いることで、特別な機器や試薬を必要とすることなく約 60 分で細胞診標本の免疫染色が可能となった。

次に、確立した迅速酵素抗体法の臨床的有用性を検証するため、イヌの腫瘍組織（n=30）

を用いて細胞診の迅速酵素抗体法と組織標本の免疫染色の診断結果を比較した。両者の一致性は $\kappa$ 係数により統計学的に評価した。その結果、迅速酵素抗体法では30例中25例(83.3%)において特異的なシグナルが検出されたが、5例では強い非特異反応のために診断ができなかった。統計学的解析では、上皮系腫瘍(n=16)ではサイトケラチン( $\kappa=0.236$ )およびビメンチン( $\kappa=0.294$ )で中等度の一致性が認められ、非上皮系腫瘍(n=14)ではサイトケラチンとビメンチンの双方で高い一致性( $\kappa=0.857$ )が認められた。

迅速多重蛍光抗体法は、下記のようにして開発した。サイトケラチンの検出のためにはマウス・モノクローナル抗体を使用し、ビメンチンの検出にはラビット・モノクローナル抗体を使用した。蛍光標識二次抗体としてはAlexa標識抗体を用いた。染色法は、抗体濃度と反応時間の検討、抗体液の混合、緩衝液による洗浄法など染色手技の徹底した省略と簡略化を行うことにより確立した。このような条件検討の結果、約45分で実施可能な迅速多重蛍光抗体法を開発することができた。本法により、一枚の細胞診標本から緑色蛍光のサイトケラチン陽性細胞、赤色蛍光のビメンチン陽性細胞および黄色蛍光の共発現細胞を同時に検出することが可能となった。本法の臨床的有用性を検証するために、イヌの腫瘍組織(n=9)および胸水(n=5)から作製した細胞診標本について、迅速多重蛍光抗体法の結果を上述の迅速酵素抗体法による結果と比較した。その結果、迅速多重蛍光抗体法では、すべての細胞診標本で特異性の高いシグナルが検出された。酵素抗体法では強い非特異反応で診断が不可能だった症例でも蛍光抗体法では免疫染色による診断が可能であった。胸水の沈渣塗抹標本では、サイトケラチン陽性の上皮系細胞とビメンチン陽性の間葉系細胞に加えて、両分子を共発現する中皮細胞を同時に鑑別することが可能だった。悪性上皮系腫瘍のリンパ節転移の症例では、リンパ節の細胞診標本で転移性の腫瘍細胞を容易に鑑別することができた。セルトリ細胞腫と診断された精巣腫瘍の症例では、非上皮系の腫瘍細胞に小数の上皮系細胞が混在する組織学的な特徴を細胞診でも確認することができた。さらに、迅速蛍光抗体法では、染色後にギムザ染色を行うことで免疫染色の結果と細胞形態との一致性を評価

することが可能であった。

本章では、細胞診でサイトケラチン、ビメンチンあるいは S-100 タンパクの検出するための方法として迅速酵素抗体法および迅速多重蛍光抗体法の開発を試み、その臨床的有用性を検証した。その結果、迅速酵素抗体法では約 60 分、迅速多重蛍光抗体法では約 45 分で免疫染色が可能となった。様々な臨床サンプルを用いて両者を比べると、感度・特異性および診断の精度の面では迅速多重蛍光抗体法に優位性があるが、特別な器機および診断者の熟練度が不要という点では迅速酵素抗体法に優位性があった。両方法は、診断施設の機器あるいは診断者の経験に応じて使い分けることが可能であり、今後、本法を利用することで獣医学領域の細胞診がより高度化することを期待したい。

## 図および表

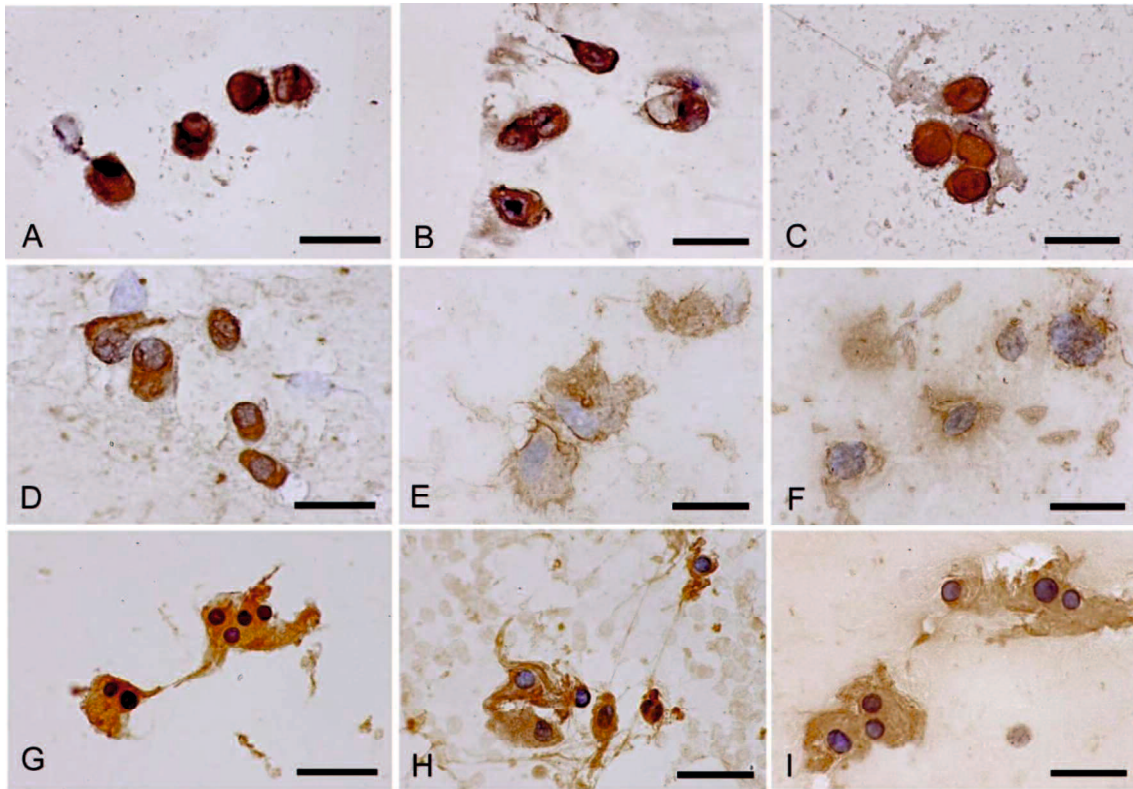


Fig. 2-1. Standard immunocytochemistry for detection of cytokeratin, vimentin, and S-100 protein. (A – C) cytokeratin, mammary anaplastic carcinoma. (D – F) vimentin, osteosarcoma. (G – I) S-100 protein, malignant peripheral nerve sheath tumor. (A, D, and G) acetone fixation. (B, E, and H) 10% neutral buffered formalin (NBF) fixation. (C, F, and I) 95% ethanol fixation. Bars= 30  $\mu$ m. Counterstain, Mayer's hematoxylin.

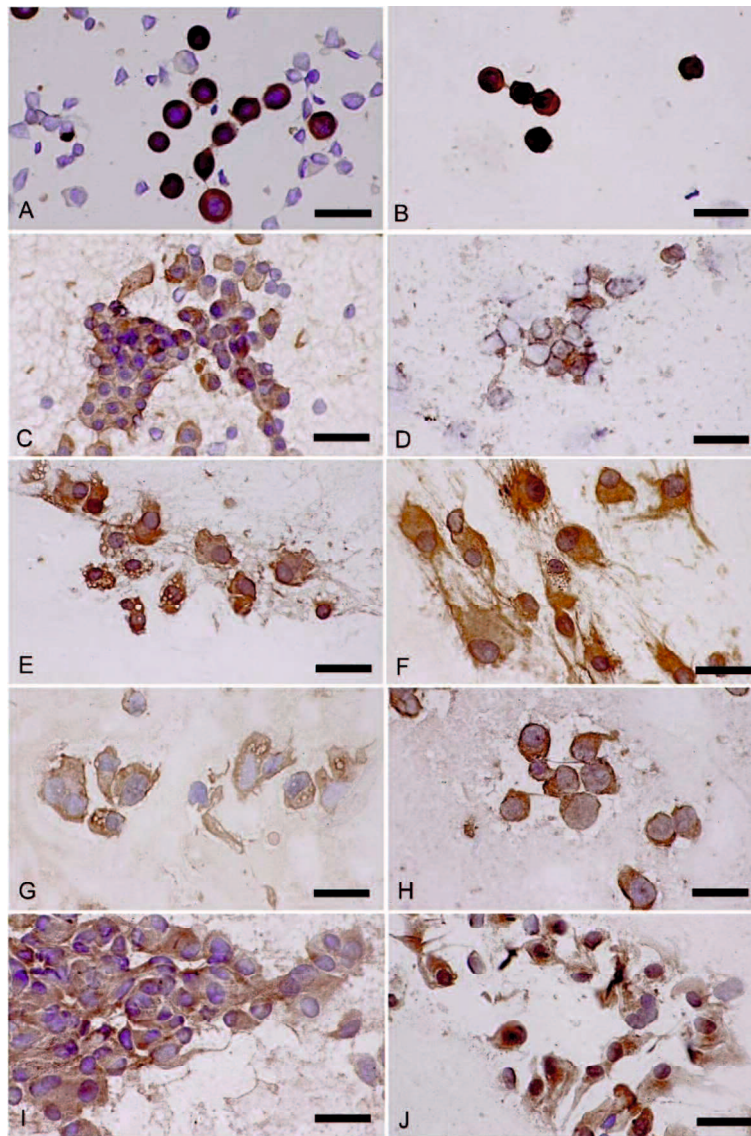


Fig. 2 - 2. Comparison of rapid immunocytochemistry and standard immunocytochemistry. (A and B) cytokeratin, mammary anaplastic carcinoma. (C and D) cytokeratin. Thyroid adenocarcinoma. (E and F) vimentin, myxosarcoma. (G and H) vimentin, fibrosarcoma. (I and J) S-100 protein, poorly pigmented melanoma. (A, C, E, G, and I) rapid immunocytochemistry. (B, D, F, H, and J) standard immunocytochemistry. Bars= 30  $\mu$ m. Counterstain, Mayer's hematoxylin.

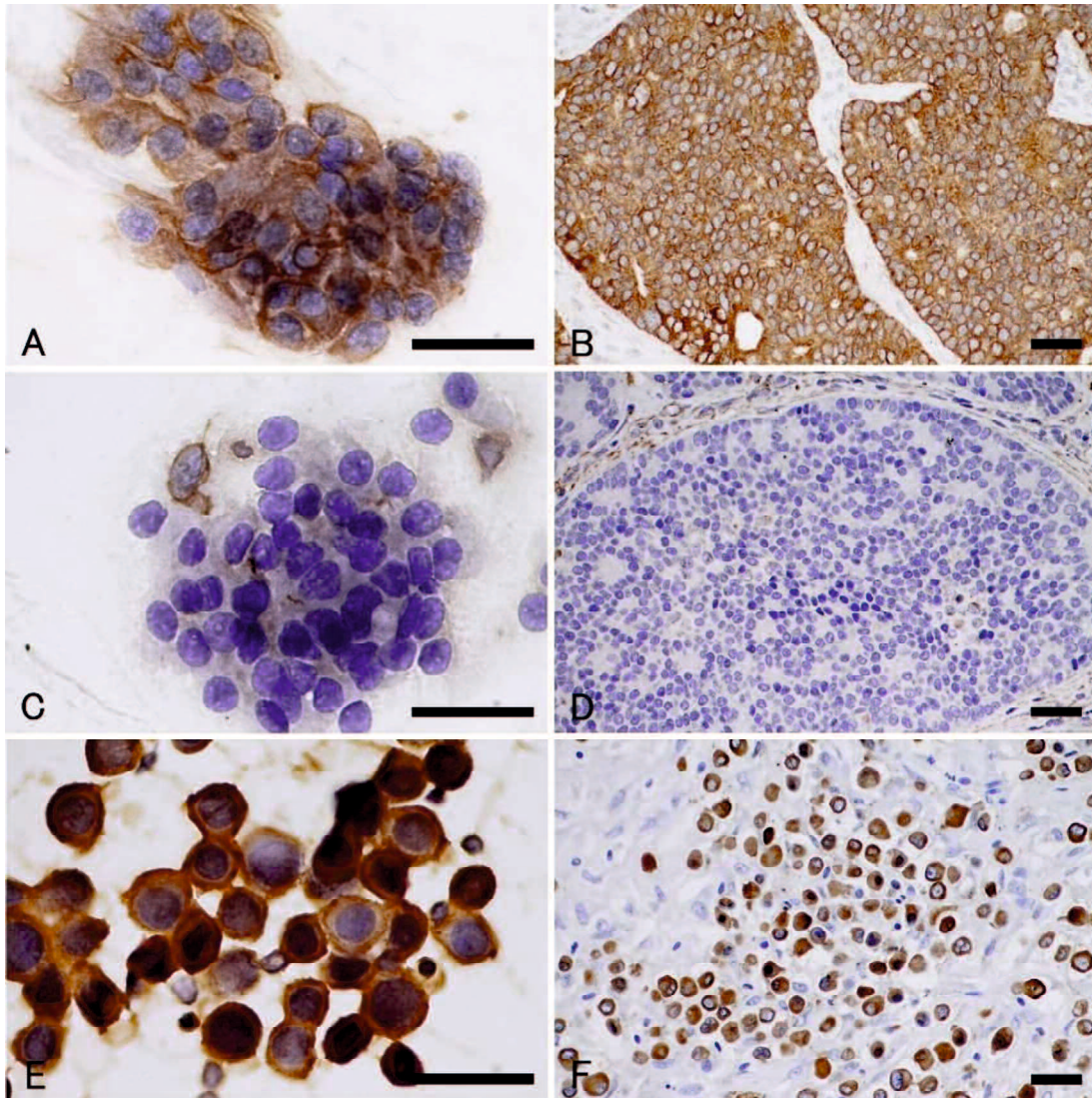


Fig. 2 - 3. Comparison of rapid immunocytochemistry (ICC) and standard immunocytochemistry (IHC) in epithelial canine tumors. Diaminobenzidine chromogen, hematoxylin counterstain, scale bars= 30  $\mu$ m. (A—D) Anal sac adenocarcinoma of a dog. (E and F) Mammary undifferentiated carcinoma of a dog. (A, B, E and F) Cytokeratin. (C and D) Vimentin. (A, C, and E) Rapid ICC. (B, D, and F) Standard IHC. Adenocarcinoma was positive for cytokeratin and negative for vimentin by rapid ICC (A and C). A case of mammary undifferentiated carcinoma, which looks like a round cell tumor, also was cytokeratin-positive by rapid ICC (E). Findings by rapid ICC completely agreed with those by standard IHC (B, D, and F).

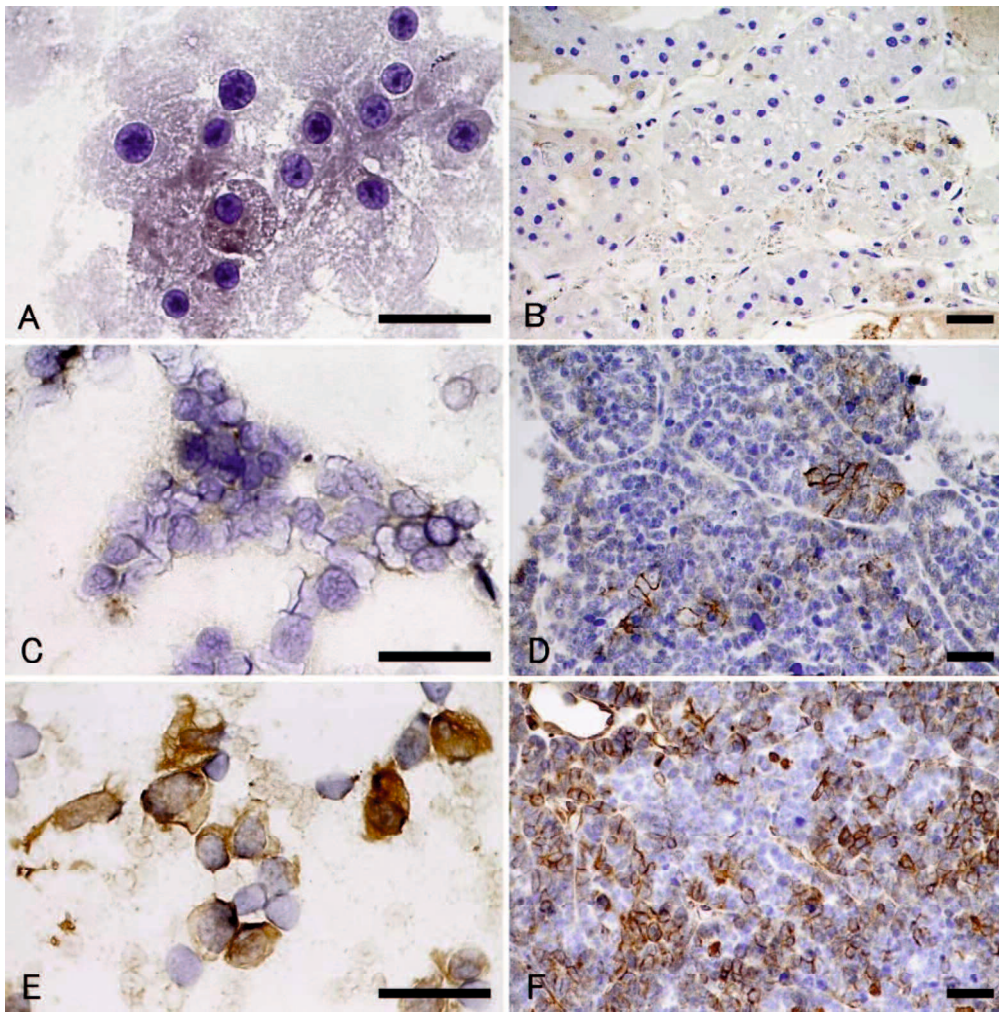


Fig. 2 - 4. Findings by rapid ICC and standard IHC in epithelial canine tumors with atypical epithelial characteristics. Diaminobenzidine chromogen, hematoxylin counterstained, scale bars= 30  $\mu$ m. (A and B) Hepatocellular adenoma of a dog. (C–F) Subcutaneous carcinoma in a dog. (A–D) Cytokeratin. (E and F) Vimentin. (A, C, and E) Rapid ICC. (B, D, and F) Standard IHC. A case of hepatocellular adenoma was negative for cytokeratin by both rapid ICC and standard IHC (A and B). In a case of subcutaneous carcinoma, no positive signals for cytokeratin were detected by rapid ICC (C), although heterogeneous positive signals were observed in standard IHC (D). Heterogeneous positive signals for vimentin were detected by both rapid ICC and standard IHC (E and F).



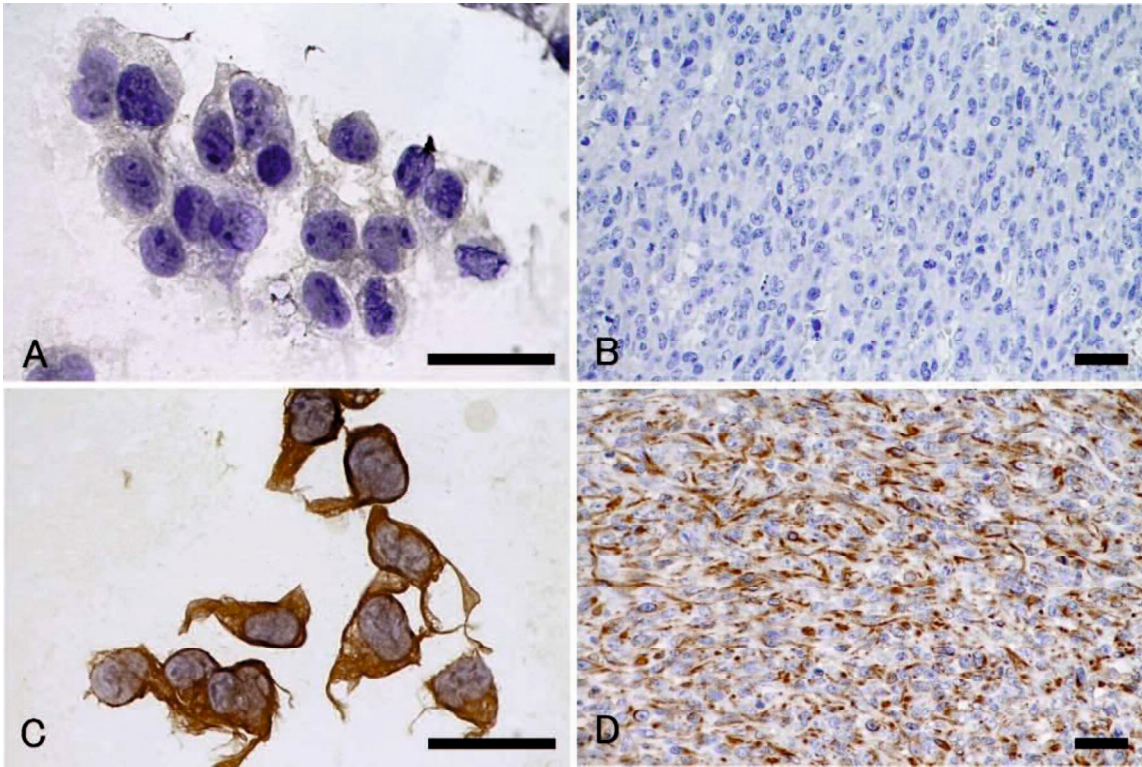


Fig. 2 - 5. Comparison of rapid ICC and standard IHC in a case of a canine hemangiosarcoma, Diaminobenzidine chromogen, hematoxyline counterstain, scale bars= 30  $\mu$ m. (A and B) Cytokeratin. (C and D) Vimentin. (A and C) Rapid ICC. (B and D) Standard IHC. Positive immunosignals for vimentin but negative for cytokeratin are observed by both rapid ICC and standard IHC.

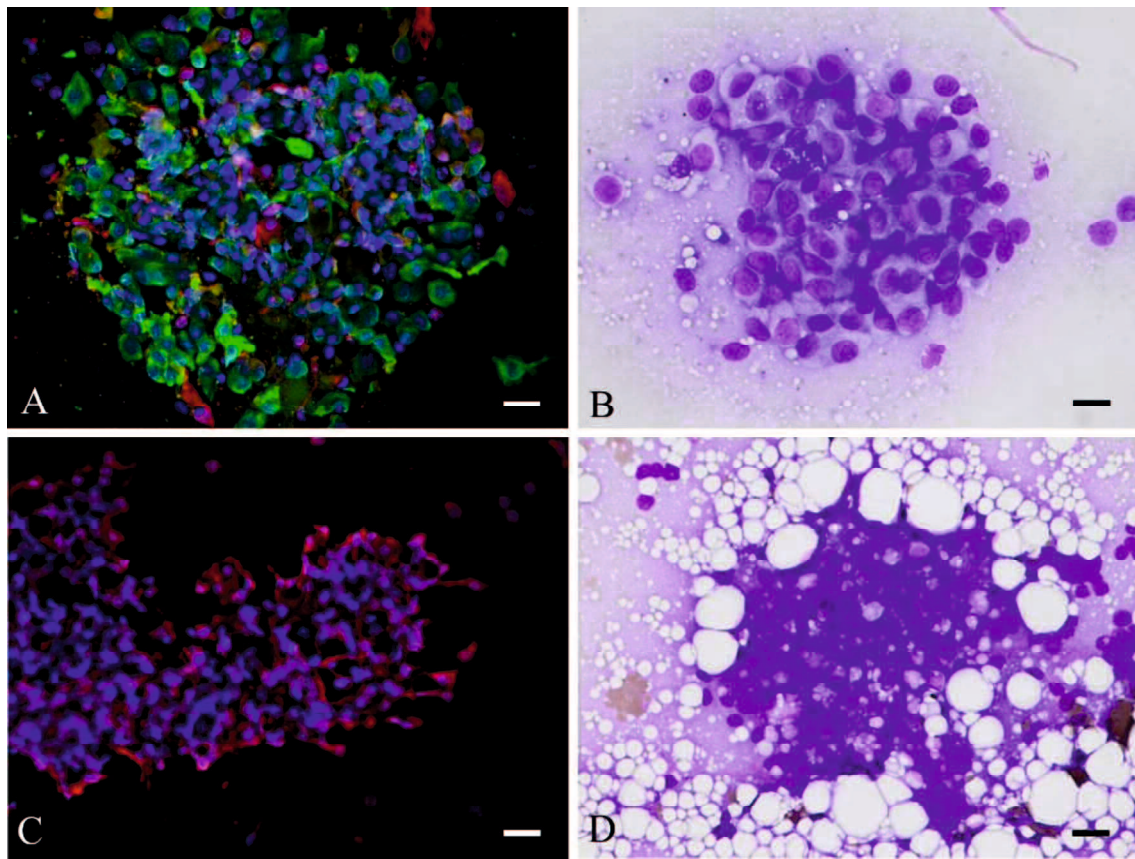


Fig. 2 - 6. Examples of the rapid immunofluorescence. A and B: adenocarcinoma of a dog. C and D: liposarcoma of a dog. A and C: rapid immunofluorescence, B and D: standard Giemsa stain. In rapid immunofluorescent panel: cytokeratin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bar = 20  $\mu$ m.

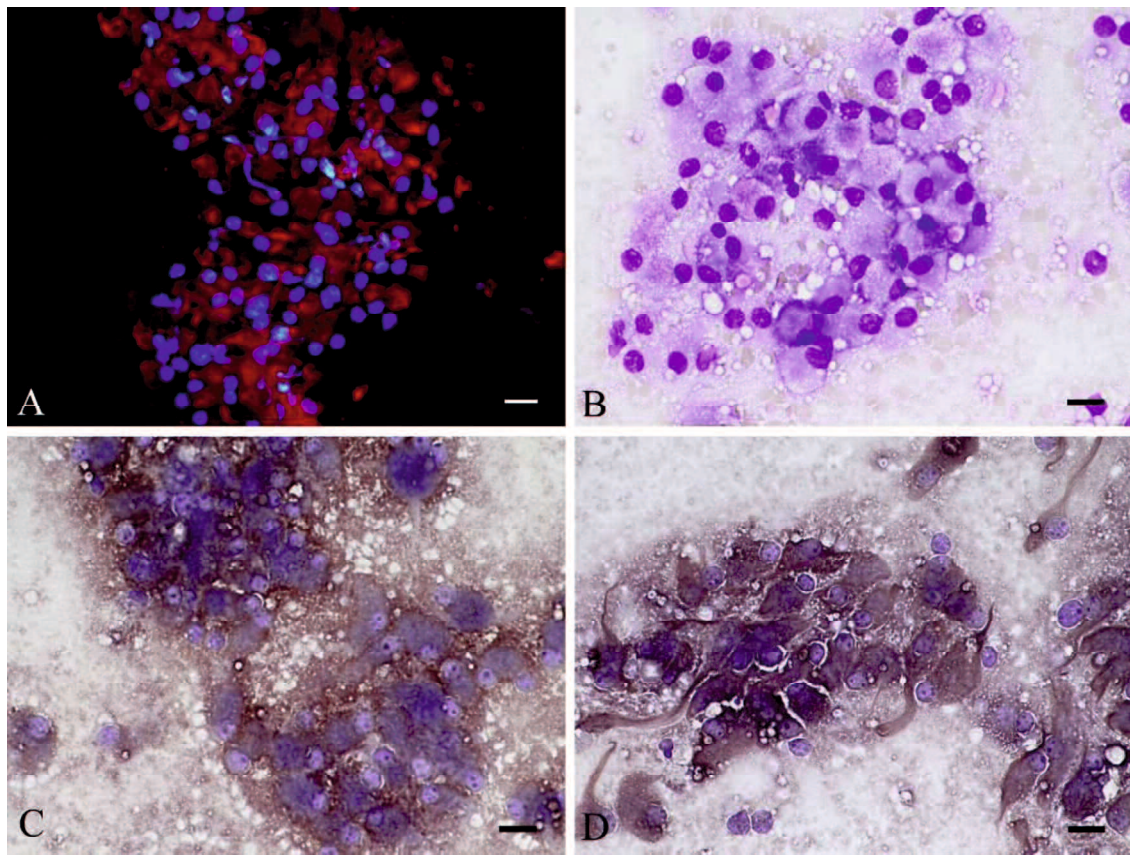


Fig. 2 - 7. A case of interstitial cell tumor in testis. A: simultaneous detection of cytokeratin and vimentin by rapid immunofluorescence, B: standard Giemsa stain, C: detection of cytokeratin by enzyme-based ICC, D: detection of vimentin by enzyme-based ICC. In rapid immunofluorescent panel: cytokeratin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bar = 20  $\mu$ m.

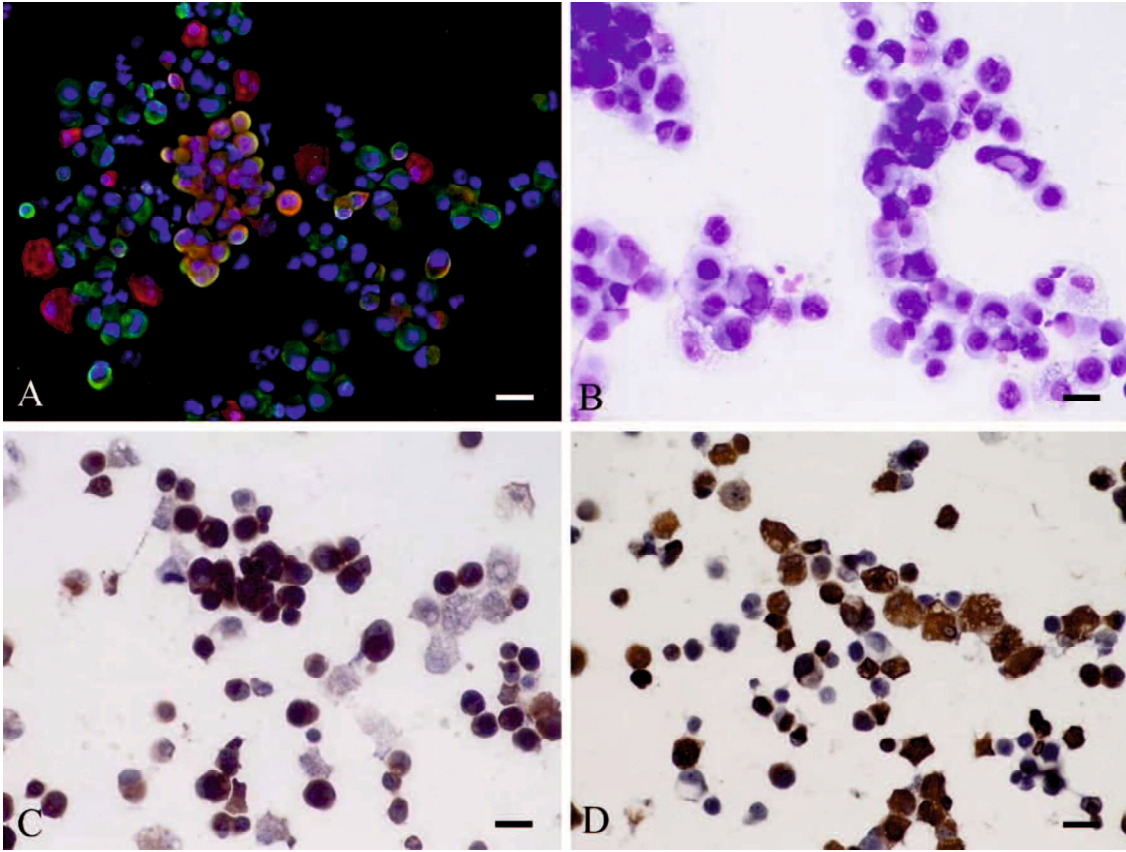


Fig. 2 - 8. A case of pleural effusion. A: simultaneous detection of cytokeratin and vimentin by rapid immunofluorescence, B: standard Giemsa stain, C: detection of cytokeratin by enzyme-based ICC, D: detection of vimentin by enzyme-based ICC. In rapid immunofluorescent panel: cytokeratin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bar = 20  $\mu$ m.

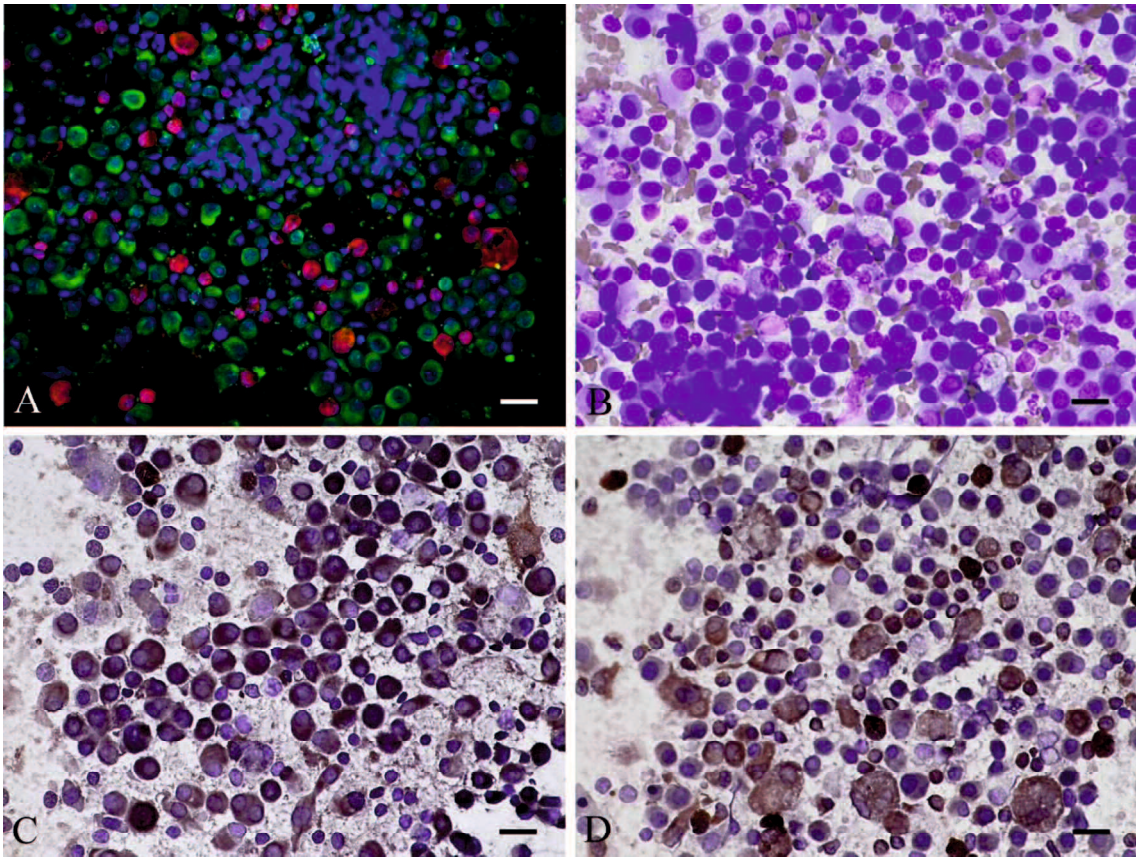


Fig 2 - 9. A case of lymphadenopathy with metastasis of epithelial tumor. A: simultaneous detection of cytokeratin and vimentin by rapid immunofluorescence, B: standard Giemsa stain, C: detection of cytokeratin by enzyme-based ICC, D: detection of vimentin by enzyme-based ICC. In rapid immunofluorescent panel: cytokeratin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bar = 20  $\mu$ m.

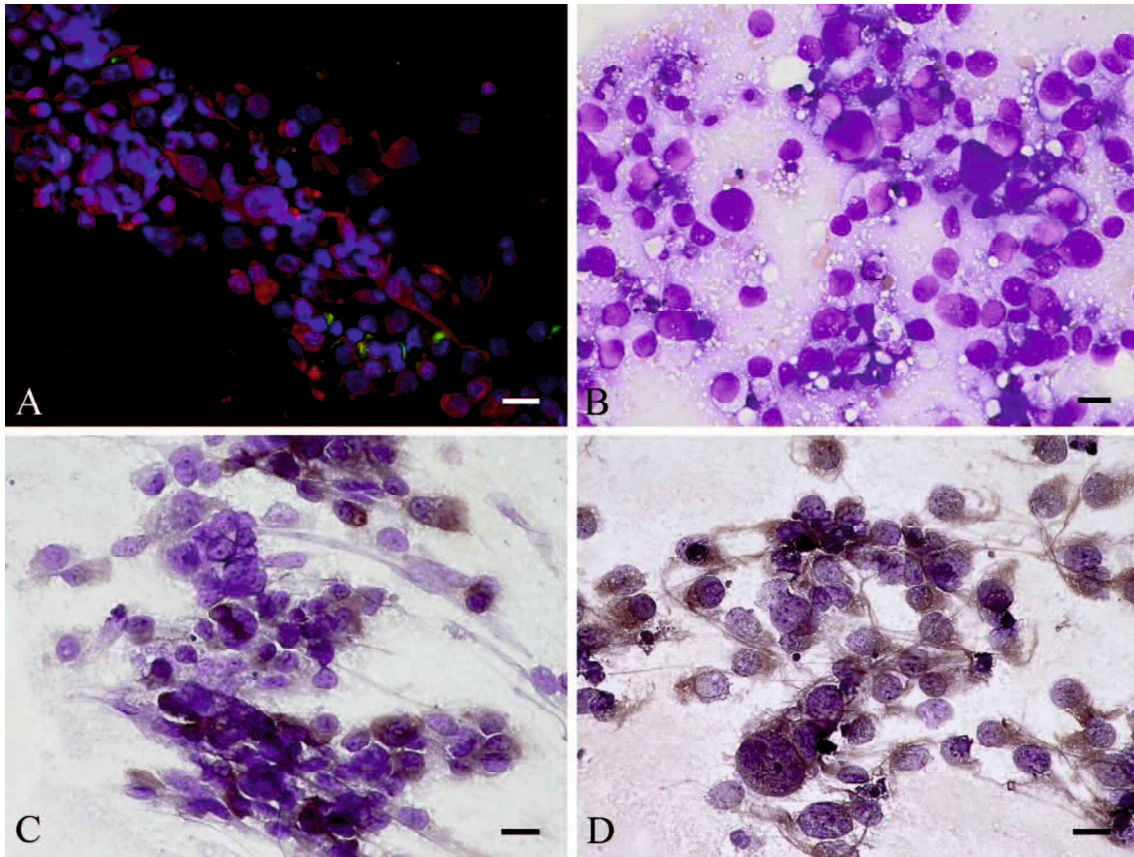


Fig 2 - 10. A case of Sertoli cell tumor in testis. A: simultaneous detection of cytokeratin and vimentin by rapid immunofluorescence, B: standard Giemsa stain, C: detection of cytokeratin by enzyme-based ICC, D: detection of vimentin by enzyme-based ICC. In rapid immunofluorescent panel: cytokeratin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bar = 20  $\mu$ m.

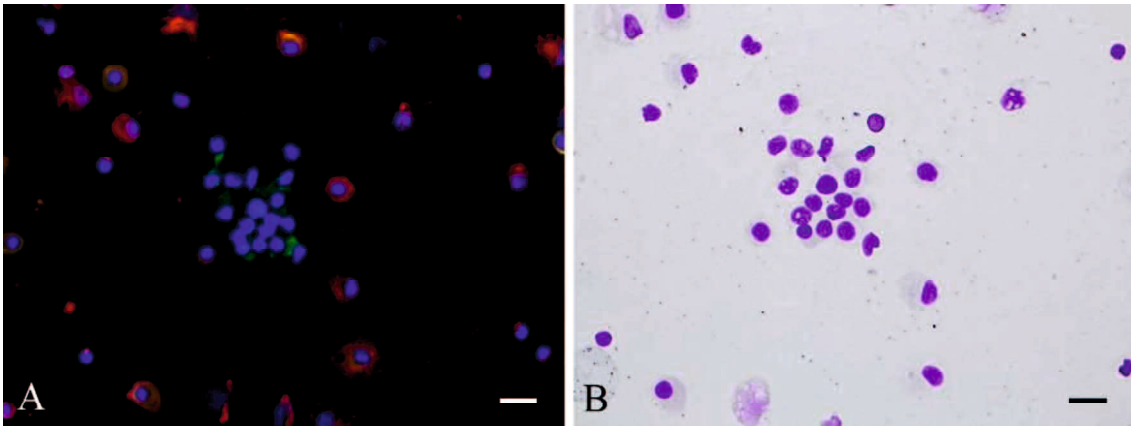


Fig. 2 - 11. A case of pleural effusion. A: simultaneous detection of cytokeratin and vimentin by rapid immunofluorescence, B: re-staining with Giemsa after the rapid immunofluorescence. In rapid immunofluorescent panel: cytokeratin-Alexa488, green; vimentin-Alexa594, red; DAPI, blue. Bar = 20  $\mu$ m.

Table 2–1. Immunopositive signals and non-specific background staining for detection of cytokeratin, vimentin, and S-100 protein in the 3 different fixatives.

Assessment	Aceton			10% NBF			95% Ethanol		
	Cyto	Vim	S-100	Cyto	Vim	S-100	Cyto	Vim	S-100
Immunoreactivity	3+	3+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+
Background staining	1+	1+	1+	1+	2+	2+	1+	2+	2+

Cyto: cytokeratin, Vim: vimentin, NBF: neutral buffered formalin, 1+: weak, 2+: moderate, 3+ strong.



Table 2—2. Procedure of rapid immunocytochemistry for cytokeratin, vimentin, and S-100 protein.

---

1	Fixation in acetone for 1 minute at 4°C
2	Washing with PBS*
3	Blocking for 5-10 minutes
4	Incubation with the primary antibodies for 5-10 minutes at 37°C **
5	Washing with PBS*
6	Incubation with the biotin-labeled second antibodies for 5 minutes at 37°C
7	Washing with PBS*
8	Incubation with peroxidase-labeled streptavidin for 5 minutes at 37°C
9	Washing with PBS*
10	Incubated with DAB for 5 minutes
11	Termination of the reaction in cold distilled water
12	Counterstaining with Mayer's hematoxyline

---

\*: 10 seconds with direct stream from a bottle.

\*\*: 5 minutes for anti-cytokeratin and anti-vimentin antibodies, and 10 minutes for anti-S-100 protein antibody.

Table 2—3. Comparison between rapid immunocytochemistry (ICC) and standard immunohistochemistry (IHC) for the detection of cytokeratin (cyto) and vimentin (vim) in canine neoplastic tissue.

Sites	Histopathologic diagnosis	Rapid ICC		Standard IHC		Agreement
		Cyto	Vim	Cyto	Vim	
<b><u>Epithelial tumors</u></b>						
Mammary gland	Adenoma	+	-	+	-	o
Mammary gland	Undifferentiated carcinoma	+	-	+	-	o
Thyroid gland	Adenoma	+	-	+	-	o
Rectum	Adenocarcinoma	+	-	+	-	o
Lung	Adenocarcinoma	+	-	+	-	o
Lung	Squamous cell carcinoma	+	-	+	-	o
Intraperitoneal	Pancreatic cell carcinoma	+	-	+	-	o
Adrenal gland	Adrenocortical adenoma	+	-	+	-	o
Subcutaneous	Carcinoma	-	H	H	H	X
Liver	Hepatocellular adenoma	-	-	-	-	o
Liver	Hepatocellular carcinoma	+	-	+	-	o
Liver	Hepatocellular carcinoma	+	+	+	-	X*
Kidney	Renal cell carcinoma	+	+	+	+	o*
Ear canal	Sebaceous gland adenoma	+	-	+	-	o
Perianal	Perianal gland adenoma	+	-	+	-	o*
Perianal	Anal sac adenocarcinoma	+	-	+	-	o
<b><u>Non-epithelial tumors</u></b>						
Liver	Hemangiosarcoma	-	+	-	+	o
Spleen	Hemangiosarcoma	-	+	-	+	o
Spleen	Malignant fibrous histiocytoma	-	+	-	+	o
Intrapelvic	Sarcoma	-	+	-	+	o
Testis	Interstitial cell tumor	+	+	+	+	o*
Lymph node	Sarcoma	+	+	-	+	X*
Trunk	Soft tissue sarcoma	-	+	-	+	o
Forelimb	Malignant peripheral nerve sheath tumor	-	+	-	+	o
Scrotum	Mast cell tumor	-	+	-	+	o
Anus	Mast cell tumor	-	+	-	+	o
Lymph node	Mast cell tumor	-	+	-	+	o
Intrathoracic	Histiocytic sarcoma	-	+	-	+	o
Intraperitoneal	Histiocytic sarcoma	-	+	-	+	o
Mediastinal	Plasmacytoma	-	+	-	+	o

H indicates heterogeneous staining (positive cells were mixed with negative cells).

\*indicates non-specific reaction observed in negative control.

Table 2—4. Procedure of rapid immunofluorescence staining.

---

- 1 Air-drying with cold air
  - 2 Fixation with cold acetone for 1 min
  - 3 Washing with PBS for 10 sec with direct stream from a bottle
  - 4 Blocking with 0.25% casein/PBS for 5-10 min at room temperature
  - 5 Incubation with primary antibodies for 15 min at 37 °C
  - 6 Washing with PBS for 10 sec with direct stream from a bottle
  - 7 Incubation with secondary antibodies and DAPI for 15 min at 37 °C
  - 8 Washing with PBS for 10 sec with direct stream from a bottle
  - 9 Coverslip with mounting medium
-

Table 2—5. Comparison between performance of rapid immunofluorescence and enzyme-based ICC in testing clinical samples.

Case	Sample	Histological and/or cytological interpretation	Immunoreaction of ICC		Immunoreaction of rapid immunofluorescence	
			Cytokeratin	Vimentin	Cytokeratin	Vimentin
1	Pleural effusion	Malignant mesothelioma	+	+	+	+
2	Pleural effusion	Malignant mesothelioma	+	+	+	+
3	Pleural effusion	Carcinoma	+	-	+	-
4	Pleural effusion	Carcinoma	+	-	+	-
5	Pleural effusion	Carcinoma	+	-	+	-
6	Testis	Interstitial cell tumor	NS	+	-	+
7	Testis	Seminoma	NS	+	-	+
8	Testis	Seminoma	-	+	-	+
9	Testis	Sertoli cell tumor	H	+	H	+
10	LN	Metastasis of perianal adenocarcinoma	+	-	+	-
11	LN	Metastasis of perianal adenocarcinoma	+	-	+	-
12	Forelimb mass	Apocrine gland carcinoma	+	-	+	-
13	Intranasal mass	Carcinoma	+	-	+	-
14	Trunck mass	Liposarcoma	NS	NS	-	+

H: heterogeneous staining; positive cells alternated with negative cells. NS: nonspecific staining

## 第3章

イヌとネコのリンパ球免疫表現型の分類のための

迅速多重蛍光抗体法

## 緒言

リンパ腫はイヌとネコに多く発生する腫瘍性疾患の一つであり、腫瘍性リンパ球のモノクローナルな増殖が原因である。腫瘍性リンパ球は、大型化、高い核/細胞質比、細胞質の強い好塩基性、大型の核小体などの形態学的特徴をもち、臨床現場ではギムザ染色による細胞診で診断されることが多い。リンパ腫の分類については新 WHO 分類による病理組織学的な診断が確立されており (Valli et al., 2011)、腫瘍性リンパ球の免疫表現型によって B 細胞型あるいは T/NK 細胞型に大別され、さらに各々の免疫表現型は多数の亜型に分類される。リンパ腫の免疫表現型は症例の予後やアウトカムに大きく影響する。例えばイヌのリンパ腫では T 細胞型リンパ腫の方が B 細胞型リンパ腫よりも予後が悪く、再発リスクも高い (Ponce et al., 2004)。そのため、リンパ腫症例の予後判断や治療計画の立案には腫瘍性リンパ球の免疫表現型の鑑別が重要である (Sözmen et al., 2005)。しかしながら、ギムザ染色標本による細胞形態学的特徴から腫瘍性リンパ球の免疫表現型を特定することは難しい。

伴侶動物のリンパ腫の免疫表現型を同定するための検査法には、フローサイトメトリー (Comazzi and Gelain, 2011)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法による T 細胞レセプター $\gamma$ 鎖および免疫グロブリン H 鎖の遺伝子再構成 (クローナリティ) 解析 (Burnett et al., 2003)、および免疫染色がある (Barger, 2014)。これらの検査のうち、フローサイトメトリーには一定量の新鮮サンプル (生細胞) の採取が必要であり、分析には高額の機器が必要である。遺伝子クローナリティ解析は少量の組織サンプルから実施可能であるが、結果が得られるまでに時間がかかり、ネコでは検査の精度もあまり高くない (Sato et al., 2011)。組織標本の免疫染色は確実な診断法であるが、コア生検を行うには麻酔などの負担が大きく、動物の年齢や腫瘍の発生部位によっては実施できないことも多い。細胞診標本を用いた免疫染色はサンプリングの侵襲性が低く、臨床現場への有用性が期待されるが、その診断技術が依然として確立されていない。

B 細胞および T 細胞に特異的なリンパ球表面抗原は各種あるが、イヌとネコで免疫染色にて検出可能なものに CD79 $\alpha$  (B 細胞マーカー) と CD3 (T 細胞マーカー) がある(Barger, 2014; Ramos-Vara et al., 2016)。酵素抗体法を用いてイヌとネコの細胞診標本からこれらの分子を免疫染色で検出した報告もあるが(Valli et al., 2009)、一般的な酵素抗体法には長時間の染色工程が必要であり、1 枚の標本から 1 つのマーカーしか検出できない欠点がある。また、標本によっては内因性酵素による非特異反応も強いため、細胞診標本での有用性は高いとはいえない。そこで、本章では、1 枚の細胞診標本から CD79 $\alpha$  と CD3 を同時に検出できる迅速多重蛍光抗体法を開発し、その臨床的有用性を検証した。

## 材料および方法

本実験は鹿児島大学の動物実験指針に従い実施された（認証番号 VM15040）。

### 実験 1 : CD79 $\alpha$ および CD3 検出のための多重蛍光抗体法の開発

#### 1. サンプル

鹿児島大学農学部獣医学科で行われた獣医外科実習に供された健常ビーグル犬 (n=3) から膝窩リンパ節を採取して細胞診（スタンプ）標本を作製した。一部の組織は O.C.T コンパウンド（Sakura Finetech, Tokyo, Japan）に包埋、ドライアイス・アセトンで凍結し、クライオスタットにより 3  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。また、鹿児島大学附属動物病院を受診した症例のうち、反応性リンパ節と診断されたイヌ 2 頭とネコ 1 頭、リンパ腫と診断されたイヌ 7 頭とネコ 8 頭から得たリンパ節の細針穿刺標本を使用した。細胞診標本は作製後すぐに風乾し、使用するまで  $-30^{\circ}\text{C}$  で未固定のまま凍結保存した。細胞診標本用に採取されたサンプルと同一組織の一部は、遺伝子クローナリティ解析（Canine-Lab, Tokyo, Japan）のために使用した。

#### 2. 試薬

蛍光抗体法は蛍光標識二次抗体を用いた間接法により行った。B 細胞を検出するためには、一次抗体は抗ヒト CD79 $\alpha$ ・マウスモノクローナル抗体 (clone HM57, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を使用し、二次抗体に FITC 標識ウマ抗マウス IgG (H+L) 血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) あるいは Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 血清 (Life Technologies, Paisley, UK) を使用した。T 細胞を検出するためには、一次抗体に抗ヒト CD3・ウサギポリクローナル抗体 (DakoCytomation) を使用し、二次抗体に Texas



Red 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 血清 (Vector Laboratories) あるいは Alexa594 標識ロバ抗ウサギ IgG (H+L) 血清 (Life Technologies) を使用した。抗体は 0.25%カゼインを含む 10 mM 生理的リン酸緩衝液 (PBS; pH7.4) により希釈した。0.25%カゼイン/PBS 溶液はブロッキング液としても使用した。核染色には 4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Dojinkagaku, Tokyo, Japan) を使用した。陰性コントロール試験には一次抗体の代わりに正常マウス IgG (DakoCytomation) および正常ウサギ IgG (DakoCytomation) を使用した。染色した標本は蛍光顕微鏡 (BX-53; Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、搭載された CCD カメラ (DP-73; Olympus) でデジタル顕微鏡写真を撮影した。デジタル写真は画像処理ソフト (cellSens Standard; Olympus) を用いて解析した。

### 3. 迅速多重蛍光抗体法のプロトコルの確立

迅速多重蛍光抗体法のプロトコルの作製手順は以下の通りである。はじめに固定液および抗原賦活化処理の必要性について検討した後、各抗体および試薬の反応時間の短縮化と染色工程の簡略化を試みた。なお、プロトコル作製のために各種条件検討には正常リンパ節の凍結組織標本を用い、次いで臨床細胞診標本における検出の成否を確認した。

#### 3-1. 固定液および抗原賦活化処理の検討

3 種類の固定液として、アセトン (4°C、10 分間)、10%中性緩衝ホルマリン (NBF; 室温、15 分間) およびメタノール (室温、1 分間) について比較検討した。抗原賦活化処理には 10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) によるマイクロウェーブ加熱処理を行った。マイクロウェーブ照射 (750W) には家庭用電子レンジ (NE-5350F; National, Osaka, Japan) を使用した。予加熱 5 分間で緩衝液を沸騰させ、スライドグラスを投入してマイクロウェーブ照射を 10 分間行った。照射後は室温で 20 分間静置した。

正常リンパ節の凍結組織標本を用いて上記の 3 種類の固定液と抗原賦活化処理の有無の

組み合わせにより 6 通りの結果を比較し、最も感度および特異性の高いシグナルが検出された方法を選定した。次いで、一次抗体の使用濃度について検討し、迅速多重蛍光抗体法のプロトコルを確立した。

完成した迅速多重蛍光抗体法のプロトコルは以下の通りである。

- 1) ドライヤーにより風乾（冷風）
- 2) 10% NBF 固定（室温、5 分間）
- 3) PBS で洗浄（洗浄ボトルによる直接噴射、10 秒間）
- 4) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング（室温、10 分間）
- 5) 2 種類の一次抗体の混合液でインキュベート（37°C、10 分間）
- 6) PBS で洗浄
- 7) 2 種類の二次抗体と DAPI の混合液でインキュベート（37°C、10 分間）
- 8) PBS で洗浄
- 9) 封入（Fuluoro Mount Plus, Diagnostic Biosystems, Delhi, India）

### 3-2. 蛍光検出後のギムザ染色とギムザ染色後の蛍光検出

蛍光顕微鏡による観察後の細胞診標本を PBS に浸漬してカバーガラスを外し、PBS で封入剤を洗浄した後、メイグリュンワルド・ギムザ染色を行って光学顕微鏡で細胞形態を観察した。また、メイグリュンワルド・ギムザ染色を行った後の迅速多重蛍光抗体法についても検討した。

## **実験 2 : 多重蛍光抗体法の有用性の検証**

### 2-1. サンプル

鹿児島大学附属動物病院にてリンパ増殖性疾患（リンパ腫あるいは反応性リンパ節）と診断されたイヌ（n=26）とネコ（n=18）の細胞診標本を用いた（実験 1 で試用した標本を含む）。使用したサンプルの内訳はリンパ節針生検標本が 26 例、胸水塗抹標本が 6 例、腫瘍の針生検標本が 8 例、血液塗抹標本が 2 例、骨髄塗抹標本が 1 例、脳脊髄液塗抹標本が 1 例であった（表 3-3）。細胞診標本は作製後すぐに風乾し、使用するまで-30°C にて未固定のまま凍結保存した。獣医師の判断により遺伝子クローナリティ解析も実施した（Canine-Lab）。

## 2-2. 画像解析

迅速多重蛍光抗体法を行った標本は蛍光顕微鏡で観察し、各標本から平均 2 枚のデジタル顕微鏡写真（400 倍）を撮影した。デジタル画像から緑色の蛍光シグナルを発する B 細胞と赤色の蛍光シグナルを発する T 細胞の数をカウントし、各々の細胞が占める割合を算出した。全リンパ球のうち 50%以上を占める免疫表現型を優位と判断し、各標本の免疫表現型とその占有率をまとめた。

## 2-3. 統計解析

リンパ腫症例では、迅速多重蛍光抗体法と遺伝子クローナリティ解析の結果を比較した。また、本法での免疫表現型（B または T 細胞型）とその占有率の差について、リンパ腫症例と反応性リンパ節症例で比較した。さらに、ROC 解析によりリンパ腫症例と反応性リンパ節を鑑別するための占有率のカットオフ値を算出した。統計解析には、PASW software program for Windows（IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA）を使用した。検定はすべてノンパラメトリック検定を用いて、5%未満を有意とした。

## 結 果

### 実験 1

#### 迅速多重蛍光抗体法の確立

正常リンパ節の凍結組織標本では、10%NBF と抗原賦活化処理無しの組み合わせにより、最も感度かつ特異性の高い蛍光シグナルが検出された (図 3-1)。10%NBF と抗原賦活化処理有りの組み合わせではシグナルの強度が低下した。アセトン固定ではリンパ節の組織形態の損傷により十分な強度のシグナルが検出されず、抗原賦活化処理を組み合わせるとさらに著しい損傷が認められ、シグナルは検出されなかった。メタノール固定では抗原賦活化処理の有無にかかわらず、蛍光シグナルは検出されなかった。

以上の結果から、10%NBF と抗原賦活化処理無しの条件下で各種抗体濃度の検討を行った。抗体の反応条件は 10 分間、37°C とした。その結果、使用した抗体はすべて各抗体製造社が推奨する希釈倍率で十分な強度のシグナルが検出された。

作製した迅速多重蛍光抗体法のプロトコルを表 3-1 に示した。本法により、CD79α (B 細胞) に対する緑色蛍光はリンパ節の皮質のリンパ濾胞と胚中心で検出され (図 3-1B)、CD3 (T 細胞) に対する赤色蛍光は傍皮質で検出された (図 3-1C)。CD79α と CD3 の 2 枚のデジタル画像をマージ (合成) すると、正常リンパ節における B 細胞領域と T 細胞領域を明瞭に鑑別できた (図 3-1D)。一次抗体の代わりに正常 IgG を用いて実施した陰性コントロール試験ではシグナルは検出されなかった。

リンパ節の凍結切片を用いて確立した迅速多重蛍光抗体法を正常リンパ節のスタンプ標本に適用した。染色が完了するまでに要する時間は約 45 分であった。観察の結果、CD79α に対する緑色蛍光と CD3 に対する赤色蛍光を高感度に検出することができ、2 枚のデジタル画像をマージすることにより、1 枚の細胞診標本から B 細胞および T 細胞を同時に検出することができた。

次いで、確率した迅速多重蛍光抗体法をイヌとネコの臨床例から得た細胞診標本 18 例に

適用した。その結果、リンパ腫の標本では B 細胞あるいは T 細胞のいずれかが優位である所見を視覚的にとらえることができ、1 枚の細胞診標本から症例の免疫表現型を予測することができた (図 3-2C および D)。本法の結果から推測された免疫表現型を遺伝子クローナリティ解析の結果と比較したところ、両検出法の結果は使用した 18 例すべてで一致した (表 3-2)。反応性リンパ節の標本では、緑色蛍光を示す B 細胞と赤色蛍光を示す T 細胞が混在する所見を視覚的にとらえることができた。

#### 蛍光検出後のギムザ染色とギムザ染色後の蛍光検出

通常のギムザ染色の後に迅速多重蛍光抗体法を適用した結果、CD79 $\alpha$  および CD3 に対する特異的なシグナルは検出されなかった。一方、迅速多重蛍光抗体法を行った後にギムザ染色を行うと、細胞の一般形態を観察することが可能であった。通常のギムザ染色標本と比較すると細胞質がやや淡明で核がやや濃染される傾向を認めるが、一般観察には十分な染色性が認められ、蛍光検出後に細胞の形態学的所見を得ることができた (図 3-3)。

## 実験 2

### 迅速多重蛍光抗体法の臨床的有用性の検討

実験 1 で確立した迅速多重蛍光抗体法をイヌ 26 例とネコ 18 例の細胞診標本に応用した。細胞診標本 44 例 (イヌ 26 例、ネコ 18 例) のうち、41 例 (93.1%) では特異性の高い蛍光シグナルが検出され、B 細胞と T 細胞を視覚的に鑑別することができた。残りの 3 例では特異的なシグナルが検出されなかった。

統計学的解析は、シグナルが検出されなかった症例と解析可能なリンパ球が 50 個以下の症例を除外して行った。解析に用いられたのは 37 例 (イヌ 22 例、ネコ 15 例) であり、1 症例あたり平均 437 のリンパ球を解析することで下記の結果を得た。

リンパ腫：リンパ腫と診断された症例は 32 例 (イヌ 19 例およびネコ 13 例) であり、1

例を除く 31 例では遺伝子クローナリティ解析も実施された。迅速多重蛍光抗体法の結果から推測された免疫表現型は、B 細胞型が 18 例、T 細胞型が 14 例であり、これらの症例における免疫表現型の占有率は平均  $96.3 \pm 4.6\%$  であった（表 3-3）。遺伝子クローナリティ解析の結果、15 例では B 細胞、14 例では T 細胞のモノクローナル増殖が検出された。遺伝子クローナリティ解析が実施されなかった 1 症例は組織病理学的に B 細胞型と診断された。遺伝子クローナリティ解析が実施された 31 例中 29 例（93.5%）で迅速多重蛍光抗体法による免疫表現型と遺伝子クローナリティ解析による免疫表現型が一致した。両検査による免疫表現型が一致しなかった 2 例（6.5%）はイヌの浅頸リンパ節とネコの鼻腔内腫瘍であった。この 2 症例は通常の細胞診でリンパ腫と診断され、迅速多重蛍光抗体法でも B 細胞が非常に優位（95%以上）であったにもかかわらず、遺伝子クローナリティ解析ではモノクローナルな増殖が検出されなかった。

反応性リンパ節：反応性のリンパ節過形成と診断された症例は 5 例（イヌ 3 例、ネコ 2 例）であった（表 3-3）。これらの症例における優位な免疫表現型の占有率は平均  $75.7 \pm 10.3\%$  であった。このうち 4 例についてはギムザ染色標本で反応性のリンパ節腫大と診断されたため、遺伝子クローナリティ解析は実施されなかった。遺伝子クローナリティ解析が実施された 1 例についてはモノクローナルな増殖は検出されなかった。

リンパ腫症例（32 例）と反応性リンパ節症例（5 例）における優位な免疫表現型の占有率を比較したところ、リンパ腫症例での占有率（中央値 97.2%、四分位範囲 95.2 - 99.1%）は、反応性リンパ節（5 例）での占有率（中央値 78.9%、四分位範囲 65.3 - 83.4%）に比べて有意に高い値を示した（Mann - Whitney  $U$  検定、 $P < 0.05$ ）。ROC 解析の結果、リンパ腫と反応性リンパ節を鑑別するカットオフ値（占有率）は 87.5% であった。

## 考 察

リンパ腫はイヌとネコで発生率の高い腫瘍性疾患であり、ギムザ染色による細胞診で診断されることが多い。リンパ腫症例の予後判定や治療法の選択には、腫瘍性リンパ球の免疫表現型が重要であるが、一般的なギムザ染色で免疫表現型を推測することは難しい。そのため本章では、イヌとネコの細胞診標本から B 細胞と T 細胞を鑑別するための迅速多重蛍光抗体法を確立した。その結果、1 枚の標本から約 45 分でリンパ球表面マーカーである CD79 $\alpha$  と CD3 を同時に検出することが可能となった。

染色プロトコルの作製のためには、はじめに健常犬のリンパ節凍結組織標本を用いて条件検討を行った。正常なリンパ節の組織は皮質、傍皮質、髄質から構成されており、皮質は B 細胞領域、傍皮質は T 細胞領域と区分されている。迅速染色法の開発に際しては、この領域が明瞭に識別できる精度の蛍光シグナルを得るための条件を検討した。各種固定液（ホルマリン、アセトン、メタノール）および抗原賦活化処理（クエン酸緩衝液による加熱処理）の有無について検討した結果、固定液としてはホルマリンが最適であり、抗原賦活化処理は不要であった。一般的に、細胞診でもホルマリン固定で免疫染色を行うためには抗原賦活化処理が必要であることが多く、これは組織中のエピトープの三次元構造が長時間のホルマリン固定により変形して抗原性が弱まることが原因とされている(Valli et al., 2009)。今回行った固定は 15 分以下であり、この短時間ではエピトープの変形がなくホルマリン固定でも問題なく抗原性が維持されていたのかもしれない。実際に、短時間のホルマリン固定であれば細胞診標本での CD79 $\alpha$  と CD3 の検出に支障がないことが過去にも報告されている(Valli et al., 2009)。アセトンは本研究の第 2 章においてサイトケラチンとビメンチンの免疫染色に最適であったが CD79 $\alpha$  と CD3 の検出には適していなかった。また、ギムザ染色の固定に用いられるメタノールでも良好なシグナルを検出することはできなかった。この結果は、細胞診の免疫染色では万能の固定液は存在せず、ターゲットとする分子あるいは抗

体の種類によって最適な固定液の検討が必要であることを示している。未染色の細胞診標本を保存する際には安易にメタノール固定を施すことを避け、後の免疫染色を考して無固定で保存することが推奨される。実際に、本研究では無固定で 2 年間冷凍保存した標本でも良好なシグナルが得られている。さらに、迅速染色法を確立するためには、各抗体の反応条件を 15 分間 (37°C) に設定して抗体の希釈濃度およびカクテル化 (複数の抗体を混合) の可否を検討した。その結果、本研究で試用したすべての抗体は製造社の推奨希釈倍率でカクテル化しても十分なシグナルが得られることが確認された。

上記のような過程を経て作製した迅速染色プロトコルを細胞診標本に適用した結果、正常リンパ節、リンパ腫、反応性リンパ節のいずれの標本においても CD79α 陽性で緑色蛍光を示すリンパ球と CD3 陽性で赤色蛍光を示すリンパ球が 1 枚の標本上で明瞭に識別でき、1 枚の標本上で識別できることができ、その所見はギムザ染色での診断と一致していた。よって、本法は細胞診で CD3 および CD79α を同時検出する迅速多重蛍光抗体法として有用性が高いと考えられた。なお、詳細な条件検討はイヌのリンパ節でしか行っていないが、ネコの細胞診標本でも本法で得られるシグナルの感度と特異性はイヌの標本と遜色なく、ネコの細胞診にも問題なく適用できると考えられた。

一般的に、蛍光抗体法は感度と特異性に優れているが、細胞の形態観察には不向きである。そのため、通常は蛍光顕微鏡下でシグナルを発した細胞がリンパ球であるかを確認する術はない。ギムザ染色を施した後に免疫染色が実施できれば理想的であるが、固定液の検討の結果から明らかのように、メタノール固定されたギムザ染色標本を免疫染色に利用することはできない。本研究では、その代替法として迅速多重蛍光抗体法を行った後の標本にギムザ染色を施して観察した。その結果、通常のギムザ染色とはやや染色性が異なるが、塗抹されている細胞の一般形態の観察に支障はなかった。これにより、迅速多重蛍光抗体法で CD3/CD79α 陽性シグナルを呈した細胞がリンパ球かどうかを形態学的に裏付けることが可能であり、本法の高い有用性の一つであった。



このように本章で確立した CD3 と CD79 $\alpha$  に対する迅速多重蛍光抗体法は伴侶動物のリンパ増殖性疾患の診断法として高い有用性があると考えられるが、実際に診断に応用するためには科学的データによる立証が必要である。よって、開発した迅速多重蛍光抗体法の臨床的有用性を立証するために、リンパ増殖性疾患と診断されたイヌとネコの細胞診標本に本法を適応して免疫表現型の鑑別を行い、遺伝子クローナリティ解析の結果との比較を行った。その結果、93.5%と高い確率で両診断法の結果が一致した。2 症例では結果が一致せず、イヌの浅頸リンパ節とネコの鼻腔内腫瘍であった。これらの症例は通常細胞診でリンパ腫と診断されており、迅速多重蛍光抗体法でも B 細胞の占有率は 95%以上と非常に高かった。一方、遺伝子クローナリティ解析では B、T 細胞ともにモノクローナル増殖が検出されなかった。遺伝子クローナリティ検査の感度はイヌ、ネコともにおよそ 80~90%とされている(Ohmura et al., 2017; Valli et al., 2011; Yagihara et al., 2007)。今回の結果は、遺伝子クローナリティ検査で診断できなかった症例でも迅速多重蛍光抗体法により免疫表現型を確定できた可能性を示しているが、組織標本での免疫染色やフローサイトメトリーによる追試を行っていないため確定的な結果ではない。

免疫染色では CD3 および CD79 $\alpha$  に陽性を示すリンパ球が腫瘍性か否かを知る術はなく、これは今回の迅速多重蛍光抗体法や組織標本の免疫染色だけでなく、フローサイトメトリーでも同様である。そのため、免疫染色でリンパ腫を診断するためには、B あるいは T 細胞が示す占有率のカットオフ値を設定することが望ましい。そこで、今回開発した迅速多重蛍光抗体法でリンパ腫の診断をするためのカットオフ値の算定を ROC 解析により行った。その結果、リンパ腫とリンパ腫を分けるための細胞占有率のカットオフ値は 87.5%と算定された。この結果から、迅速多重蛍光抗体法を用いた観察により約 9 割以上のリンパ球が同一のシグナルを発した場合、そのシグナルにより B 細胞型リンパ腫あるいは T 細胞型リンパ腫と診断できると考えられる。一方、信頼性の高いカットオフ値の設定にはさらに多くの症例データの蓄積が必要であり、今後さらに症例数を増やして解析を行う必要が

あるだろう。

以上のように、本章では一枚の細胞診標本から CD3 と CD79 $\alpha$  に対するシグナルを同時に検出する迅速多重蛍光抗体法を開発し、その臨床的有用性を検証した。その結果、約 45 分と短時間で完了する高感度な染色法が開発され、高い臨床的有用性が確認された。一枚の細胞診標本からリンパ球の免疫表現型を推定できる本法の適用範囲は広く、本法がイヌとネコのリンパ増殖性疾患における有用な診断ツールとして広く活用されることが期待される。一方、伴侶動物のリンパ腫には CD79 $\alpha$  と CD3 の双方に陽性あるいは陰性を示す非典型的なタイプがあることも報告されており(Pohlman et al., 2009)、また、CD4 や CD8 といった他のマーカーによる細分の必要性も指摘されている(Deravi et al., 2017)。今後、細胞診をより高度な診断法として発展させていくためには、その他のリンパ球表面抗原についても迅速かつ実用的な検出法を開発するべきであると考えられる。

## 小 括

イヌおよびネコのリンパ腫において、腫瘍性リンパ球の免疫表現型（B 細胞あるいは T 細胞）を鑑別することは、予後判断や治療計画の立案に重要であるが、通常のギムザ染色標本で免疫表現型を推測することは困難である。そのため、免疫表現型の決定には、フローサイトメトリーや遺伝子クローナリティ解析などの追加検査が必要となる。しかしながら、これらの検査には特別な技術や機器が必要であり、結果が得られるまでの時間も要する。そこで本章では、一般的な細胞診標本からリンパ球の免疫表現型を鑑別するための迅速多重蛍光抗体法を確立し、その臨床的有用性を検証した。

本研究では、T 細胞のマーカーとして CD3 を、B 細胞のマーカーとして CD79 $\alpha$  を検出のターゲットとした。はじめに、抗 CD3・ウサギポリクローナル抗体、抗 CD79 $\alpha$ ・マウスモノクローナル抗体および Alexa 標識二次抗体を用いた迅速多重蛍光抗体法の開発を試みた。そのためには、イヌの正常リンパ節の凍結標本を用いて、固定液（10%中性緩衝ホルマリン、アセトン、メタノール）、抗原賦活化処理（クエン酸緩衝液による加熱）、抗体の濃度およびカクテル化などの各種条件を検討した。次いで、確立した迅速多重蛍光抗体法を細胞診標本（イヌの正常リンパ節、イヌとネコの反応性リンパ節およびリンパ腫）の臨床標本へ適用した。迅速多重蛍光抗体法によって推測された免疫表現型は遺伝子クローナリティ解析の結果と比較し、さらに、ROC 解析を用いてリンパ腫と非リンパ腫を鑑別するための占有細胞のカットオフ値を算出した。

各種条件検討の結果、固定液はホルマリン固定が最適であり、抗原賦活化処理は必要としなかった。確立した染色法はイヌの正常リンパ節の凍結切片だけでなく、イヌとネコの細胞診標本でも高感度かつ特異性の高いシグナルを検出することが可能であった。これにより、一枚の細胞診標本から約 45 分と短時間で CD79 $\alpha$  陽性 B 細胞と CD3 陽性 T 細胞を同時に検出する迅速多重蛍光抗体法が開発された。本法は迅速かつ高感度であるだけでなく、本法

の後に通常のギムザ染色を施すことで一般細胞形態を観察できる利便性も兼ね備えていた。

次いで、リンパ腫と診断されたイヌおよびネコの 31 例における免疫表現型を本法と遺伝子クローナリティ解析で比較したところ、93.5% (29/31) と高い確率で結果が一致した。

さらにリンパ球増殖性疾患と診断された臨床標本 40 例で行った ROC 解析では、リンパ腫と非リンパ腫を分ける特定細胞数 (CD3 あるいは CD79 $\alpha$  陽性細胞) の占有率のカットオフ値は 87.5% と算出された。

以上をまとめると、本章では約 45 分と短時間で CD3 と CD79 $\alpha$  を同時に検出できる迅速多重蛍光抗体法を開発することができた。本法を用いることでリンパ腫症例の免疫表現型を一枚の細胞診標本から推定することが可能であり、さらには、各々の表現型の細胞占有率を算定することでリンパ腫と非リンパ腫の鑑別も可能であると考えられた。本法の臨床的な実用性および有用性は非常に高いと考えられ、イヌとネコのリンパ増殖性疾患の非侵襲的診断法として広く活用されることが期待される。

## 図および表

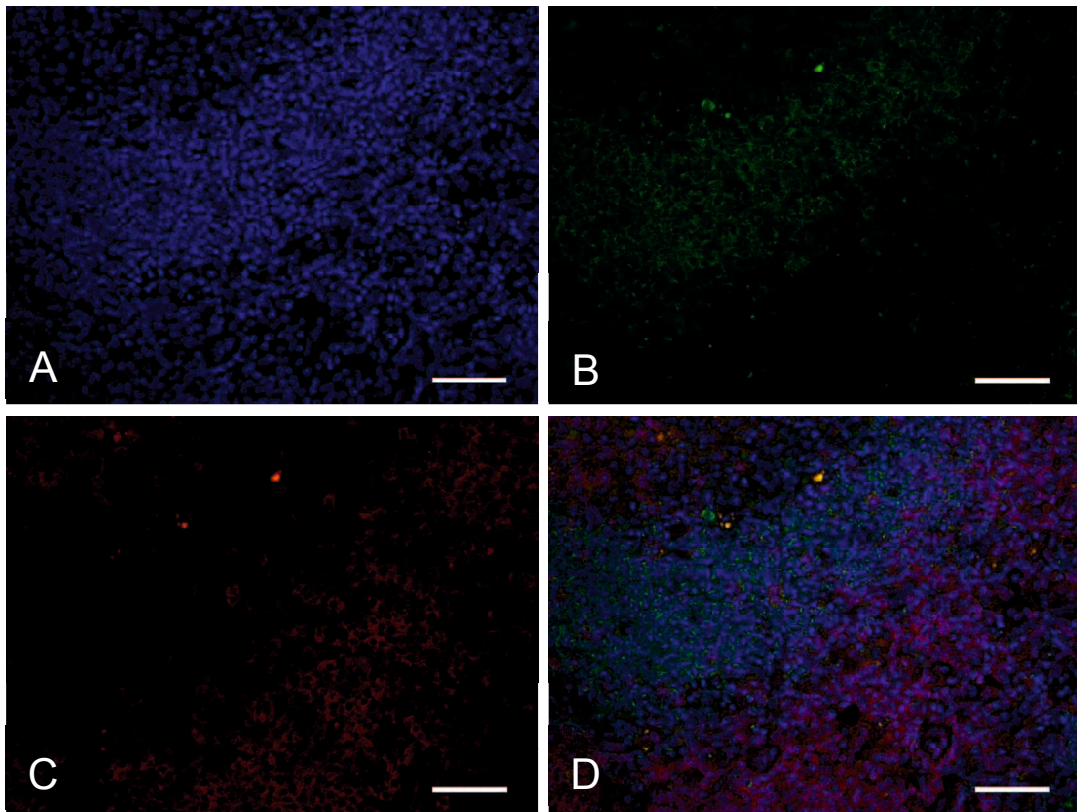


Fig. 3 - 1. Multiple immunofluorescence staining for detection of CD79 $\alpha$  and CD3 antigens in frozen sections of normal lymph nodes obtained from healthy Beagles. Fixation with 10% neutral buffered formalin without antigen retrieval. (A) DAPI, (B) CD79 $\alpha$ —FITC, (C) CD3—Texas Red, (D) merged image. Bar=50  $\mu$ m.

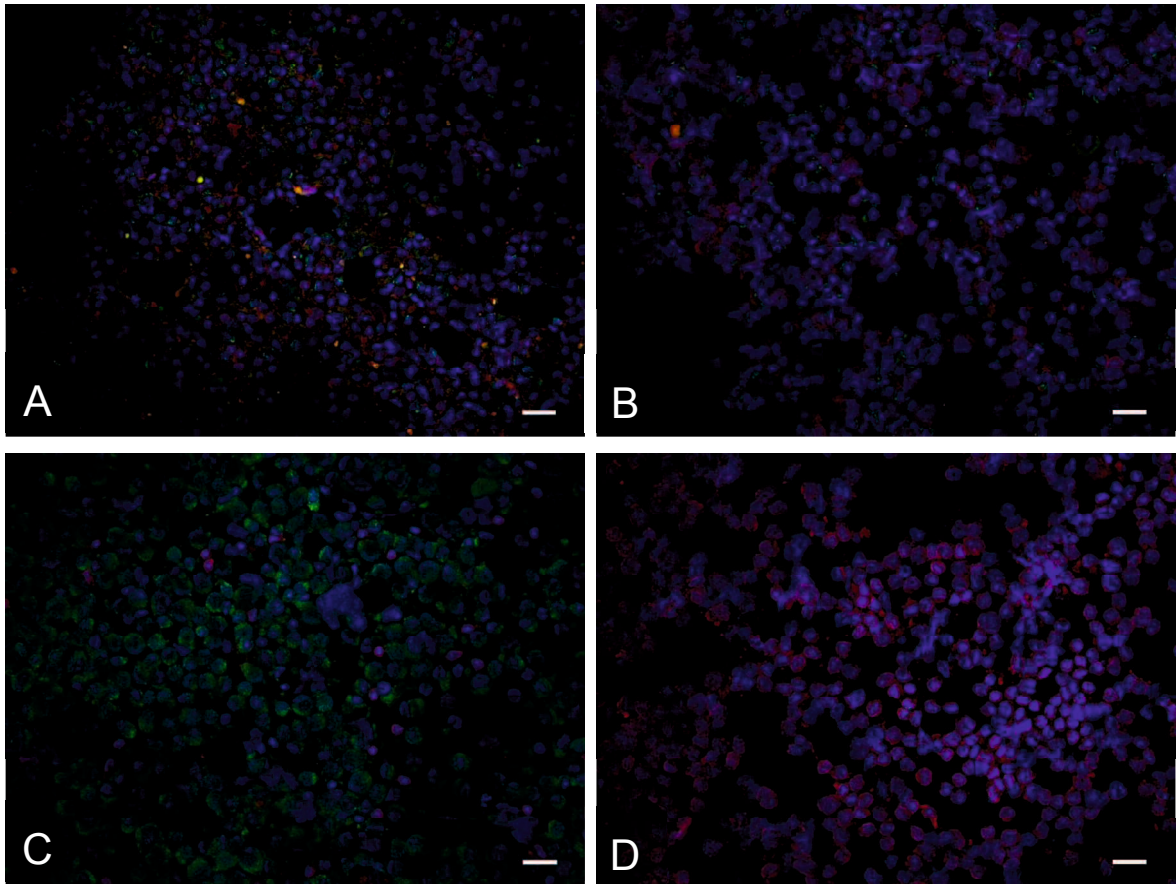


Fig. 3 - 2. Multiple immunofluorescence staining for detection of CD79 $\alpha$  and CD3 antigens in air-dried smears of normal lymph node and clinical samples from dogs and cats. In all panels: CD79 $\alpha$ —FITC, green ; CD3—Texas Red, red; DAPI, blue. (A) Impression smear from a normal lymph node of a dog, (B) fine-needle aspirate smear from a reactive lymph node of a cat, (C) fine-needle biopsy smear from a superficial cervical lymph node of a dog with B-cell lymphoma, (D) pleural effusion smear from a cat with T-cell lymphoma. Bar= 20  $\mu$ m.

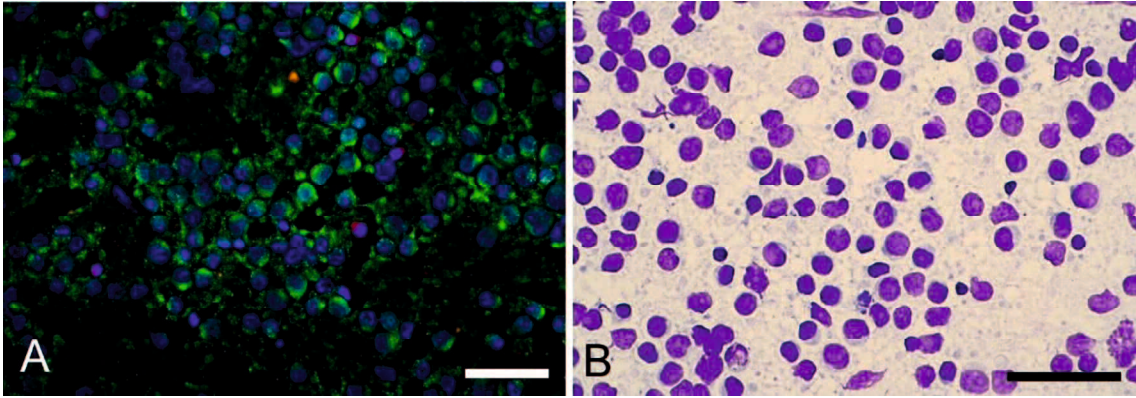


Fig. 3 - 3. A fine-needle aspirate smear from a dog with B-cell lymphoma. (A) Multiple immunofluorescence staining with antibodies to CD79 $\alpha$ —FITC (green), CD3—Texas Red (red), and DAPI (blue). (B) Giemsa staining after the multiple immunofluorescence protocol. Bar= 20  $\mu$ m.



Table 3—1. Protocol for multiple immunofluorescence staining of cytology smears in the present study.

---

1. Air dry
  2. Fix in 10% neutral buffered formalin for 15 min
  3. Wash 3 times with PBS for 5 min
  4. Block with 0.25% casein / PBS for 30 min
  5. Incubate with the mixture of primary antibodies for 20 min\*
  6. Wash 3 times with PBS for 5 min
  7. Incubate with the mixture of secondary antibodies for 20 min\*
  8. Wash 3 times with PBS for 5 min
  9. Counterstain with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
  10. Wash with PBS for 5 min
  11. Coverslip
- 

\*see details in the text

Table 3—2. Comparison between immunophenotyping results from multiple immunofluorescence (MIF) and clonality analysis in canine and feline lymphomas.

Case	Species	Sample	Prediction of immunophenotype	
			MIF	Clonality
1	Canine	Popliteal lymph node FNB	T	T
2	Canine	Superficial cervical lymph node FNB	B	B
3	Canine	Submandibular lymph node FNB	B	B
4	Canine	Submandibular lymph node FNB	B	B
5	Canine	Submandibular lymph node FNB	T	T
6	Canine	Axillary lymph node FNB	B	B
7	Canine	Superficial cervical lymph node FNB	B	B
8	Feline	Pleural effusion	T	T
9	Feline	Facial mass FNB	B	B
10	Feline	Pleural effusion	T	T
11	Feline	Colonic mass impression smear	B	B
12	Feline	Mesenteric lymph node FNB	T	T
13	Feline	Kidney FNB	B	B
14	Feline	Pleural effusion	T	T
15	Feline	Abdominal mass FNB	B	B

MIF: Multiple immunofluorescence test in the present study; FNB: Fine-needle biopsy

Table3-3. Comparison of predominance ratio between Immunofluorescent staining and clonality analysis.

Species	Sites	Immunofluorescent staining		Clonality
		Immunophenotype	Predominance ratio	
<b><u>Lymphomas</u></b>				
Canine	Superficial cervical LN	B	95.7	B
Canine	Superficial cervical LN	B	94.8	B
Canine	Superficial cervical LN	B	99.0	B
Canine	Superficial cervical LN	B	94.3	B
Canine	Superficial cervical LN	B	98.4	B
Canine	Submandibular LN	B	99.1	B
Canine	Popliteal LN	B	94.9	B
Canine	Bone marrow smear	B	98.1	B
Canine	Superficial cervical LN	B	98.6	Negative
Canine	Superficial cervical LN	T	97.4	T
Canine	Superficial cervical LN	T	93.4	T
Canine	Submandibular LN	T	100.0	T
Canine	Submandibular LN	T	96.2	T
Canine	Popliteal LN	T	98.3	T
Canine	Mesenteric LN	T	100.0	T
Canine	Mesenteric LN	T	96.8	T
Canine	Popliteal LN	T	84.7	T
Canine	Pleural effusion	T	100.0	T
Feline	Subcutaneous mass	B	99.2	B
Feline	Abdominal mass	B	78.1	B
Feline	Splenic mass	B	98.8	B
Feline	Kidney	B	93.2	B
Feline	Kidney	B	96.4	B
Feline	Colonic mass	B	95.2	B
Feline	Pleural effusion	B	96.0	B
Feline	Mesenteric LN	T	99.9	T
Feline	Intranasal mass	B	96.6	Negative
Feline	Pleural effusion	T	100.0	T
Feline	Pleural effusion	T	100.0	T
Feline	Pleural effusion	T	100.0	T
Feline	Pleural effusion	T	97.0	T
<b><u>Hyperplastic lymph nodes</u></b>				
Canine	Submandibular LN	B	83.4	ND
Canine	Submandibular LN	B	78.9	ND
Canine	Popliteal LN	B	65.3	ND
Feline	Superficial cervical LN	T	86.6	Negative
Feline	Popliteal LN	T	64.5	ND

LN: Lymph node, ND: Not determined

## 総 括

細胞診は、伴侶動物の腫瘍性疾患の非侵襲的診断法として重要な検査であり、臨床現場で日常的に行われている。一般的には乾燥塗抹標本のロマノウスキー染色（ライト・ギムザ、メイグリユンワルド・ギムザあるいは簡易ギムザ染色）で行われるが、経験と主観に頼りがちであるため決して精度が高い診断法とはいえない。非侵襲的な検査法により確定診断を導くことは獣医療の高度化のために必須であるが、そのためには高度な技術や機器を必要としない実用的な診断技術の開発が必要である。そこで本研究では、伴侶動物の腫瘍細胞診の高度化に向けた基礎的研究を行った。第 1 章では、人医の細胞診で主流のパパニコロウ（Pap; Papanicolaou）染色について、その迅速法を伴侶動物の細胞診に応用して腫瘍診断への有用性を検討した。第 2 章では、細胞診で上皮系腫瘍と間葉系腫瘍を鑑別するための迅速免疫染色法を開発し、その臨床的有用性を検討した。さらに、第 3 章では、細胞診でリンパ球の免疫表現型（B 細胞型/T 細胞型）を識別するための迅速多重蛍光抗体法を開発し、その臨床応用を検討した。

第 1 章では、乾燥標本での有用性が報告されている乾燥迅速（rapid-air-dry; RAD）-Pap 染色をイヌとネコの細胞診に応用した。特に腫瘍細胞の悪性度については客観的な評価を行うために形態計測学的解析を行った。その結果、RAD-Pap 染色は腫瘍細胞をその分化度に応じて色彩豊かに染色し、クロマチンや核小体といった核の微細構造も明瞭に染め分けた。形態計測学的解析では、特に核小体に関する悪性度評価において一般的なギムザ染色よりも優れていた。一方で、細胞や核の大小不同性、核/細胞質比のバラつきに関する悪性度評価ではギムザ染色より劣っていた。Pap 染色は通常は湿固定が必須であるため伴侶動物の臨床現場では導入が難しいが、ルーチン検査として取り入れることができれば診断精度の向上につながることを期待された。しかしながら、今回の研究結果から、伴侶動物の細胞診では Pap 染色が必ずしもギムザ染色より優れているわけではないことが明らかになった。

これは今回用いた RAD-Pap 染色が一般的な Pap 染色より劣っているためとは考え難い。考えられる要因の一つとして、ヒトと伴侶動物では発生する腫瘍のタイプに違いがあることが挙げられる。一般的に、ヒトでは上皮系腫瘍の発生頻度が高く、上皮系腫瘍では核の微細構造が明瞭な Pap 染色の特徴は上皮系腫瘍の悪性度評価には適している。一方、イヌやネコでは間葉系腫瘍の発生頻度が高く、その悪性度評価には細胞や核の大小不同性の描出に優れるギムザ染色の方が適しているのかもしれない。本研究における腫瘍の悪性度評価は腫瘍の系統別に行ったものではない。RAD-Pap 染色の有用性をより正確に評価するためには上皮系腫瘍、間葉系腫瘍および円形細胞腫の各々で検証を行う必要があると考えられた。しかしながら、RAD-Pap 染色が約 15 分と短時間で実施でき、かつ、細胞の分化度や核の微細構造の描出に優れる特徴があることは本研究でも立証されており、伴侶動物腫瘍細胞診でもルーチンで利用できる副次的な染色法としてその有用性が期待される。

第 2 章では、細胞診標本から腫瘍細胞の由来を識別するための迅速免疫染色法の開発を行った。腫瘍細胞は、その悪性度が高いほど細胞形態による由来の識別が困難になる。このような場合、組織標本では免疫染色による診断が行われるが、細胞診では未だ実用的な診断法とはいえない。そこで、本研究では、細胞の由来の鑑別に有用な分子として、サイトケラチン、ビメンチンおよび S-100 タンパクの検出を細胞診で行うための迅速免疫染色法を開発した。検出系としては、一般的な酵素抗体法と多重染色が可能な蛍光抗体法の 2 種類の迅速免疫染色法を開発した (S-100 タンパクは酵素抗体法のみ)。迅速酵素抗体法で約 60 分、迅速多重蛍光抗体法で約 45 分といずれも短時間で良好なシグナルを得ることができたが、その感度と特異度は迅速多重蛍光抗体法の方が優れていた。また、迅速多重蛍光抗体法は、1 枚の細胞診標本からサイトケラチンとビメンチンを同時に検出が可能、両分子の共発現細胞 (中皮細胞) の識別が可能、免疫染色後にギムザ染色で一般細胞形態の観察が可能といった酵素抗体法にはない優位性が証明された。一方で、蛍光顕微鏡および画像のマージ (合成) が可能な画像解析ソフトが必要、かつ、蛍光抗体法にはある程度の熟練が必要という点では

酵素抗体法よりも優れているとはいえなかった。このように各々の方法に利点と欠点はあるが、開発した迅速免疫染色法が細胞診で腫瘍細胞の由来を鑑別するための強力な診断ツールとして広く活用されることを期待したい。

第 3 章では、細胞診においてリンパ球の免疫表現型の鑑別を行うための迅速多重蛍光抗体法を開発した。結果として、約 45 分で 1 枚の細胞診標本上で T 細胞マーカーである CD3 と B 細胞マーカーである CD79 $\alpha$  を高感度に検出できる診断法を確立することができた。本法を数多くの臨床症例に適用し、遺伝子クローナリティ解析との比較やリンパ腫症例と非リンパ腫症例との比較を行った結果、本法がリンパ球の免疫表現型の鑑別において信頼性の高い診断法であり、リンパ腫と非リンパ腫の鑑別にも有用性が高いことが示された。本診断法の活用範囲は広く、遺伝子クローナリティ解析、組織標本（コア生検標本）の免疫染色あるいはフローサイトメトリーに勝るとも劣らない診断ツールになることが期待される。

以上、本研究では伴侶動物の腫瘍細胞診の精度向上のために、RAD-Pap 染色の有用性およびサイトケラチン、ビメンチン、S-100 タンパク、リンパ球表面抗原（CD3 および CD79 $\alpha$ ）に対する迅速免疫染色法の開発と有用性について様々な検討を行った。特に迅速免疫染色法の有用性は高く、診断者の経験と主観に左右される伴侶動物の細胞診に分子レベルでの根拠を与える実用性の高い診断ツールの開発を行うことができたと考えている。本研究は、伴侶動物の細胞診を高度化させるための第一歩ともいえるものであり、今後、さらに多くの診断マーカーを用いた検査法が開発されることを期待したい。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、多くの助言を下さいました鹿児島大学共同獣医学部獣医学科臨床病理学教室 大和 修 教授、本研究の遂行にあたり終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました鹿児島大学共同獣医学部獣医学科臨床病理学教室 矢吹 映 准教授ならびに多くの御助言下さいました岐阜大学・鳥取大学共同獣医学部基礎獣医学講座解剖学教室 保坂 善真 准教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くの助言を頂き、助力を惜しまれなかった神山萌子さんを始めとする研究室の皆様から心から感謝いたします。

最後に、本研究を支えた多くの動物達に追悼の意を表し、深く感謝いたします。

## 参考文献

- Barger, A. M. (2014). Immunocytochemistry. pp. 532–53. In: Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. 4th ed. (Valenciano, A. C. and Cowell, R. L, eds.), MO, Elsevier.
- Basolo, F., Baloch, Z. W., Baldanzi, A., Miccoli, P., and Li Volsi, V. A. (1999). Usefulness of Ultrafast Papanicolaou-stained scrape preparations in intraoperative management of thyroid lesions. *Mod. Pathol.*, 12, 653–657.
- Burnett, R. C., Vernau, W., Modiano, J. F., Olver, C. S., Moore, P. F., and Avery, A. C. (2003). Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.*, 40, 32–41.
- Cervantes-Arias, A. C., Pang, L. Y., and Argyle, D. J. (2013). Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. *Vet. Comp. Oncol.*, 11, 169–184.
- Chan, J. K. and Kung, I. T. (1988). Rehydration of air-dried smears with normal saline. Application in fine-needle aspiration cytologic examination. *Am. J. Clin. Pathol.*, 89, 30–34.
- Christensen, E., Bofin, A., Gudmundsdóttir, I. and Skogvoll, E. (2008). Cytological diagnosis of basal cell carcinoma and actinic keratosis, using Papanicolaou and May-Grünwald-Giemsa stained cutaneous tissue smear. *Cytopathology* 19, 316–322.
- Colledge, S. L., Raskin, R. E., Messick, J. B., Tiffany Reed, L., Wigle, W. L. and Balog, K.



- A. (2013). Multiple joint metastasis of a transitional cell carcinoma in a dog. *Vet. Clin. Pathol.*, 42, 216–220.
- Comazzi, S. and Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet. J.*, 188, 149–155.
- Deravi, N., Berke, O., Woods, J. P. and Bienzle, D. (2017). Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 191, 5–13.
- Einstein, A. J., Yang, G. C., Silberfarb, J. B. and Gil, J. (1997). Effect of ultrafast Papanicolaou staining on nuclear and textural features in breast cancer cytology. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 19, 361–367.
- Ersoz, S., Sert, H., Yandi, M., Erem, C., Mungan, S., Ersoz, H. O., Cobanoglu U., Hacıhasanoglu, A. (2008). The significance of galectin-3 expression in the immunocytochemical evaluation of thyroid fine needle aspiration cytology. *Pathol. Oncol. Res.*, 14, 457–460.
- Francz, M., Egervari, K. and Szollosi, Z. (2011). Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: Comparison of frozen sections, imprint cytology and immunocytochemistry. *Cytopathology* 22, 36–42.
- Fritz, D., Freeman, K. P., Hopfner, C., Dela Fontaine, O., Seroka, M., Simon, F., Musch D. and Rabeyrin, M. (2005). Multilobulated “flower” cells in a subcutaneous mass aspirate from a cat. *Vet. Clin. Pathol.*, 34, 429–433.
- Gumber, S., Fowlkes, N. and Cho, D.-Y. (2011). Disseminated sclerosing peritoneal

- mesothelioma in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23, 1046–1050.
- Höinghaus, R., Hewicker-Trautwein, M. and Mischke, R. (2007). Immunocytochemical differentiation of neoplastic and hyperplastic canine epithelial lesions in cytologic imprint preparations. *Vet. J.*, 173, 79–90.
- Höinghaus, R., Hewicker-Trautwein, M. and Mischke, R. (2008). Immunocytochemical differentiation of canine mesenchymal tumors in cytologic imprint preparations. *Vet. Clin. Pathol.*, 37, 104–111.
- Igor B, B. and Werner, B. (2010). *Immuno-histochemistry Basics and Methods*. NY, Springer.
- Jörundsson, E., Lumsden, J. H. and Jacobs, R. M. (1999). Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Vet. Clin. Pathol.*, 28, 100–108.
- Kamal, M. M., Kulkarni, M. M. and N., W. R. (2011). Ultrafast papanicolaou stain modified for developing countries: efficacy and pitfalls. *Acta Cytologica* 55, 205–212.
- Katayama, H., Maeda, S., Hosone, M., Hara, H., Sanno, N., Shimura, T., Yokoyama M. and Naito, Z. (2004). A case of glioblastoma (gemistocytic type) immunostaining efficacy in intraoperative diagnosis. *J. Jap. Soc. Clin. Cytol.*, 43, 331–334.
- Key, M. (2006). *Methods of Immunocytology for Slide-based Cellular Analysis*. pp. 95–101. In: *Immunocytochemical Staining Methods*, 4th ed. (Key, M. ed.), CA, DakoCytomation.
- Lemos, L. B., Baliga, M. and Cason, Z. (1997). Ultrafast Papanicolaou stain: one year's

- experience in a fine needle aspiration service. *Acta Cytologica* 41, 1630–1631.
- Ligato, S., Mandich, D. and Cartun, R. W. (2008). Utility of glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from other primary and metastatic lesions in FNA of the liver: an immunocytochemical study. *Mod. Pathol.*, 21, 626–31.
- Maeda, S., Yokoyama, M. and Naito, Z. (2005). Rapid cytological diagnosis correlated with clinical medicine. *Nihon Ikadaigaku Igakukai Zasshi* 1, 102–109.
- Mehta, N., Modi, L., Patel, T. and Shah, M. (2010). Study of cytomorphology of solid pseudopapillary tumor of pancreas and its differential diagnosis. *J. Cytol.*, 27, 118–122.
- Meinkoth J. H., Cowell, R.D. and Morton R. J. (2014). Sample Collection and Preparation. pp. 1–19. In: Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. 4th ed. (Valenciano, A. C. and Cowell. R. L. eds.), MO, Elsevier.
- Minato, H. (2000). Ultrafast-Papanicolaou stain on air-dried smears, with its application to intraoperative diagnosis. *Med. Technol.*, 28, 1269–1273.
- Moriya, J., Tanino, M. A., Takenami, T., Endoh, T., Urushido, M., Kato, Y., Wang L., Kimura T., Tsuda M., Nishihara H. and Tanaka, S. (2016). Rapid immunocytochemistry based on alternating current electric field using squash smear preparation of central nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol.*, 33, 13–18.
- Ng, W. F., Choi, F. B., Wu, C., Leung, C. F. and Ng, C. S. (1994). Rehydration of air-dried smears with normal saline. Application in fluid cytology. *Acta Cytologica* 38, 56–64.
- Ohmura, S., Leipzig, M., Schöpfer, I., Hergt, F., Weber, K., Rütgen, B. C., Tsujimoto H.,

- Hermanns W. and Hirschberger, J. (2017). Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Vet. Comp. Oncol.*, 15, 194–207.
- Papanicolaou, G. N. (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 95, 438–439.
- Pérez, C. C., Rodríguez, I., Dorado, J. and Hidalgo, M. (2005). Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches. *Vet. Rec.*, 156, 648–650.
- Pohlman, L. M., Higginbotham, M. L., Welles, E. G. and Johnson, C. M. (2009). Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet. Pathol.*, 46, 259–268.
- Ponce, F., Magnol, J. P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K. and Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.*, 167, 158–166.
- Przeździecki, R., Czopowicz, M. and Sapieryński, R. (2015). Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, 44, 597–604.
- Przeździecki, R. and Sapieryński, R. (2014). Using of immunocytochemistry in differential diagnosis of neoplasms of serosal cavities in dogs. *Pol. J. Vet Sci.*, 17, 149–59.
- Ramos-Vara, J. A., Avery, A. C. and Avery, P. R. (2010). Advanced Diagnostic Techniques. pp. 395–437. In: *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*,

- 2nd ed. (Raskin, R. E. and Meyer, D. J. eds.), MO, Saunders.
- Ramos-Vara, J. A., Avery, P. R. and Avery, A. C. (2016). Advanced Diagnostic Techniques. pp. 453–494. In: *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*, 3rd ed. (Raskin, R. E. and Meyer, D. J. eds.), MO, Saunders.
- Ramos-Vara, J. A., Miller, M. A. and Johnson, G. C. (2001). Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. *Vet. Pathol.*, 38, 636–643.
- Raskin, R. E. (2001). General Categories of Cytologic Interpretation. pp. 15–21. In: *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*, 2nd ed. (Raskin, R. E. and Meyer, D. J. eds.), MO, Saunders.
- Salem, A. A., Douglas-Jones, A. G., Sweetland, H. M., Newcombe, R. G. and Mansel, R. E. (2002). Evaluation of axillary lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry. *Br. J. Surg.*, 89, 1386–1389.
- Sato, H., Fujino, Y., Uchida, K., Ohno, K., Nakayama, H. and Tsujimoto, H. (2011). Comparison between immunohistochemistry and genetic clonality analysis for cellular lineage determination in feline lymphomas. *J. Vet. Med. Sci.*, 73, 945–947.
- Schulte, E. and Wittekind, C. (1987). The influence of the wet-fixed papanicolaou and the air-dried giemsa techniques on nuclear parameters in breast cancer cytology: A cytometric study. *Diagn. Cytopathol.*, 3, 256–261.
- Shidham, V. B., Lindholm, P. F., Kajadacsy-Balla, A., Chang, C. C. and Komorowski, R.

- (2000). Methods of cytologic smear preparation and fixation. Effect on the immunoreactivity of commonly used anticytokeratin antibody AE1/AE3. *Acta Cytologica* 44, 1015–1022.
- Skoog, L. and Tani, E. (2011). Immunocytochemistry: An indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology* 22, 215–229.
- Sözmen, M., Tasca, S., Carli, E., De Lorenzi, D., Furlanello, T. and Caldin, M. (2005). Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17, 323–330.
- Thompson, C. A., and Rebar, A. H. (2016). Body cavity fluid. pp. 191–219. In: *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*, 3rd ed. (Raskin, R. E. and Meyer, D. J. eds.), MO, Elsevier.
- Tyler, R. D., Cowell, R. L., Baldwin, C. J. and Morton, R. J. (1999). Introduction. pp. 1–19. In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*, 2nd ed. (Cowell, R. L., Tyler, R. D. Meinkoth, J. H. eds.), MO, Mosby.
- Valli, V. E., Myint, M. S., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham A., Ehnart, E. J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Lebel, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H. and Vernau, W. (2011). Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Vet. Pathol.*, 48, 198–211.
- Valli, V., Peters, E., Williams, C., Shipp, L., Barger, A., Chladny, J. and Hoffmann, W. (2009). Optimizing methods in immunocytochemistry: One laboratory's experience.

- Vet. Clin. Pathol., 38, 261–269.
- Van Eyken, P., Sciot, R., Callea, F., Ramaekers, F. and Schaart G, D. V. (1990). A cytokeratin-immunohistochemical study of hepatoblastoma. *Hum. Pathol.*, 21, 302–308.
- Van Eyken, P., Sciot, R., Paterson, A., Callea, F., Kew, MC, Desmet, V. J. (1988). Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.*, 19, 562–568.
- Vobornik, S. and Nabity, M. B. (2014). Male Reproductive Tract: Prostate, Testes, Penis, and Semen. pp. 431–445 In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 4th ed. (Valenciano A. C. and Cowell, R. L, eds.). MO, Elsevier.
- Walke, V., Sisodia, S. M., Bijwe, S. and Patil, P. (2017). Clear-cell meningioma: Intraoperative diagnosis by squash cytology: Case report and review of the literature. *Asian J. Neurosurg.*, 12, 293–295.
- Yagihara, H., Tamura, K., Isotani, M., Ono, K., Washizu, T. and Bonkobara, M. (2007). Genomic organization of the T-cell receptor  $\gamma$  gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 115, 375–382.
- Yang, G. C. (1994). The mathematical basis for the increased sensitivity in cancer detection in air-dried cytopreparations. *Mod. Pathol.*, 7, 681–684.
- Yang, G. C. (1995). Ultrafast Papanicolaou stain is not limited to rapid assessments: Application to permanent fine-needle aspiration smears. *Diagn. Cytopathol.*, 13, 160–

162.

Yang, G. C., and Alvarez, I. I. (1995). Ultrafast Papanicolaou stain. An alternative preparation for fine needle aspiration cytology. *Acta Cytologica* 39, 55–60.

Yang, G. C. H. (1995). Ultrafast Papanicolaou stain: a superior stain for fine-needle aspiration cytology applied in conjunction with the rehydration of air-dried smears by normal saline solution technique. *Adv. Anat. Pathol.*, 2, 208–211.

Yang, G. C. H. (2003). Long microvilli of mesothelioma are conspicuous in pleural effusions processed by Ultrafast Papanicolaou stain. *Cancer* 99, 17–22.

Yang, G. C. H., Liebeskind, D. and Messina, A. V. (2006). Diagnostic accuracy of follicular variant of papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspirates processed by ultrafast papanicolaou stain: Histologic follow-up of 125 cases. *Cancer* 108, 174–179.

Yang, G. C. and Hoda, S. A. (1997). Combined use of the “scratch and smear” sampling technique and Ultrafast Papanicolaou stain for intraoperative cytology. *Acta Cytologica* 41, 1513–1518.

Yoshida, K., Choisunirachon, N., Saito, T., Matsumoto, K., Saeki, K., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sasaki, N. and Nakagawa, T. (2014). Hepatocyte growth factor-induced up-regulation of Twist drives epithelial–mesenchymal transition in a canine mammary tumour cell line. *Res. Vet. Sci.* 97, 521–526.