

ORIGINAL ARTICLE

悪性胸膜中皮腫診断におけるセルブロックを併用した胸水細胞診の有用性についての単一施設後ろ向き研究

橋本昌樹¹・結城美智子²・中道 徹¹・中村晃史¹・黒田鮎美¹・松本成司¹・近藤展行¹・佐藤鮎子²・辻村 亨²・長谷川誠紀¹

A Retrospective Single-Institutional Analysis of the Usefulness of Pleural Effusion-Cell Block for Diagnosing Malignant Pleural Mesothelioma

Masaki Hashimoto¹; Michiko Yuki²; Toru Nakamichi¹; Akifumi Nakamura¹; Ayumi Kuroda¹; Seiji Matsumoto¹; Nobuyuki Kondo¹; Ayuko Sato²; Tohru Tsujimura²; Seiki Hasegawa¹

¹Department of Thoracic Surgery, ²Division of Molecular Pathology, Department of Pathology, Hyogo College of Medicine, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** The pleural effusion-cell block procedure has recently been recognized as an effective tool for diagnosing malignant pleural mesothelioma (MPM). We retrospectively analyzed the usefulness of pleural effusion-cell block for diagnosing MPM in our institution. **Patients and Methods.** Forty-four patients who underwent a video-assisted thoracoscopic pleural biopsy due to suspicion of MPM between January 2018 and December 2018 were enrolled in this retrospective study. We compared the results of a preoperative cytological examination, including cell block, with those of a pathological examination by a pleural biopsy. **Results.** Of the 44 patients, 25 preoperatively underwent a cytological examination, including the cell block procedure. The cytological examination revealed malignant cells suspected of being MPM in 18 patients, atypical cells in 3 patients and no malignant cells in 4 patients. A pathological examination by a pleural biopsy revealed MPM in 22 patients, including 3 patients in whom a cytological examination revealed atypical cells and 1 in whom a cytological examination revealed no malignant cells. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of the cytological examination in this study were 81.8% (18/22), 100% (3/3) and 100% (18/18) and 42.9% (3/7), respectively. **Conclusions.** Our findings suggest that a cytological examination with the cell block procedure is useful for diagnosing MPM.

(JLCC. 2020;60:972-978)

KEY WORDS — Malignant pleural mesothelioma, Pleural biopsy, Pleural effusion cytology, Cell block

Corresponding author: Masaki Hashimoto.

Received April 21, 2020; accepted September 14, 2020.

要旨 — **目的.** 悪性胸膜中皮腫 (MPM) の胸水細胞診にセルブロック (CB) が行われるようになってきたが、その有用性は十分に検証されていない。 **方法.** 2018年1月から同年12月の間にMPMを疑い全身麻酔下胸膜生検が施行された44例のうち、生検前にCBを併用した胸水細胞診が行われた25例を対象とし、胸膜生検の診断結果とCBを併用した胸水細胞診の判定結果を後ろ向きに比較した。 **結果.** 25例中、22例は胸膜生検でMPMと診断され、3例で悪性所見は認めなかった。MPMと診断された22例のうち18例は胸水細胞診で悪性細胞を認め

positiveとされたが、残りの3例は異型細胞を認めたが悪性と断定できずsuspiciousと、1例は異型細胞を認めずnegativeと判定された。胸膜生検で悪性所見を認めなかった3例は胸水細胞診でもnegativeと判定されていた。MPM診断におけるCBを併用した胸水細胞診の感度は81.8% (18/22)、特異度100% (3/3)、陽性的中率100% (18/18)、陰性的中率42.9% (3/7)であった。 **結論.** MPM診断においてCBを併用した胸水細胞診は有用である。

索引用語 — 悪性胸膜中皮腫, 胸膜生検, 胸水細胞診,

セルブロック

背景

悪性胸膜中皮腫 (MPM) は、胸膜に発生する予後不良の悪性腫瘍である。胸水貯留を伴うことが多く、初発症状として咳嗽や労作時呼吸困難を主訴に発見されることが多い。原発性肺癌など他の多くの癌腫では胸水細胞診により診断に至ることがあるが、MPM においては、肺腺癌などの他癌腫との鑑別が容易でないことや良悪性の鑑別が困難であるため、MPM の確定診断は病理組織診断により行われることがガイドラインで推奨されている。¹⁻⁵

一方、セルブロック (CB) は胸水などの体腔液検体をホルマリンなどで固定し、包埋、薄切を行うことで、疑似組織的な検体スライドを作製する方法である。胸水などの体腔液検体であっても CB を作製することで多数の免疫組織化学的染色を行うことが可能である。また MPM の診断においては、2 つ以上の中皮細胞の陽性抗体および 2 つ以上の中皮細胞の陰性抗体を用いた免疫組織化学的染色が求められるが、^{1,6} MPM 診断における CB を併用した胸水細胞診の有用性は十分に検証されていない。そこで、当施設において臨床経過や画像所見により MPM を疑い全身麻酔下胸腔鏡下胸膜生検を施行した症例の中から生検前に CB を併用した胸水細胞診が行われていた症例を抽出し、胸膜生検の診断結果と胸水細胞診の判定結果を比較することで、MPM 診断における CB を併用した胸水細胞診の有用性を後方視的に検討した。

方法と対象

対象

2018 年 1 月から 2018 年 12 月までに MPM を疑い全身麻酔下胸腔鏡下胸膜生検を兵庫医科大学病院で施行した 44 例のうち、生検前に CB を併用した胸水細胞診が行われていた 25 例を本研究の対象とした。

検査方法および診断方法

胸水塗抹標本を用いて Papanicolaou 染色および Giemsa 染色を行い、細胞形態学的に良悪性を判定した。CB を用いて hematoxylin-eosin (HE) 染色および免疫組織化学的染色を行い、異型細胞および悪性細胞の起源 (細胞種) を評価した。当院における胸水 CB の作製方法は以下の通りである。1) 採取した胸水を 1500 回転、10 分間で遠心する。2) 沈渣を少量の上清と混合して Eppendorf 型チューブへ回収する。3) 再遠心した後、上清を取り除

き、10% 中性緩衝ホルマリンを重層して室温で一晩固定する。4) 固定終了後にチューブをメスで切断し沈渣 (細胞) を取り出し、パラフィン包埋、薄切して標本を作製する。

CB を併用した胸水細胞診では、異型細胞が以下の i) ~iv) の所見を全て満たす場合を positive (malignant cells, 推定病変 MPM) と判定した。異型細胞を認めるが悪性と断定できない場合は suspicious (atypical cells)、悪性細胞や異型細胞を認めない場合は negative と判定した。^{3,4}

i) 塗抹標本 (Papanicolaou 染色および Giemsa 染色) で細胞形態学的に悪性が支持される。

ii) CB の免疫組織化学的染色でサイトケラチンが陽性である。

iii) CB の免疫組織化学的染色で中皮腫陽性マーカー (calretinin, WT-1, D2-40, HEG-1) のうち 2 つ以上が陽性である。

iv) CB の免疫組織化学的染色で中皮腫細胞の中皮腫陰性マーカー (CEA, TTF-1, napsin-A, claudin-4) のうち 2 つ以上が陰性である。

CB を併用した胸水細胞診で positive (malignant cells, 推定病変 MPM) と判定した症例における病理学的所見の典型例を Figure 1 に示す。

病理組織診断は全症例において全身麻酔下胸腔鏡下胸膜生検により行った。胸膜生検は Hashimoto らが報告しているように基本的に 1 カ所の創から胸腔鏡と鉗子を同時に挿入し、複数部位より壁側胸膜を原則的に全層採取した。⁷ 生検された壁側胸膜のパラフィンブロックを作製して HE 染色および免疫組織化学的染色を行い、異型細胞が以下の i) ~iv) の所見を全て満たす場合を MPM と診断した (Figure 2)。^{3,5}

i) HE 染色標本で深部脂肪織浸潤を伴う異型細胞の増殖を認める。

ii) 免疫組織化学的染色でサイトケラチンが陽性である。

iii) 免疫組織化学的染色で中皮腫陽性マーカー (calretinin, WT-1, D2-40, HEG-1) のうち 2 つ以上が陽性である。

iv) 免疫組織化学的染色で中皮腫陰性マーカー (CEA, TTF-1, napsin-A, claudin-4) のうち 2 つ以上が陰性である。

胸膜生検において MPM と診断された典型例の病理学的所見の典型例を Figure 2 に示す。

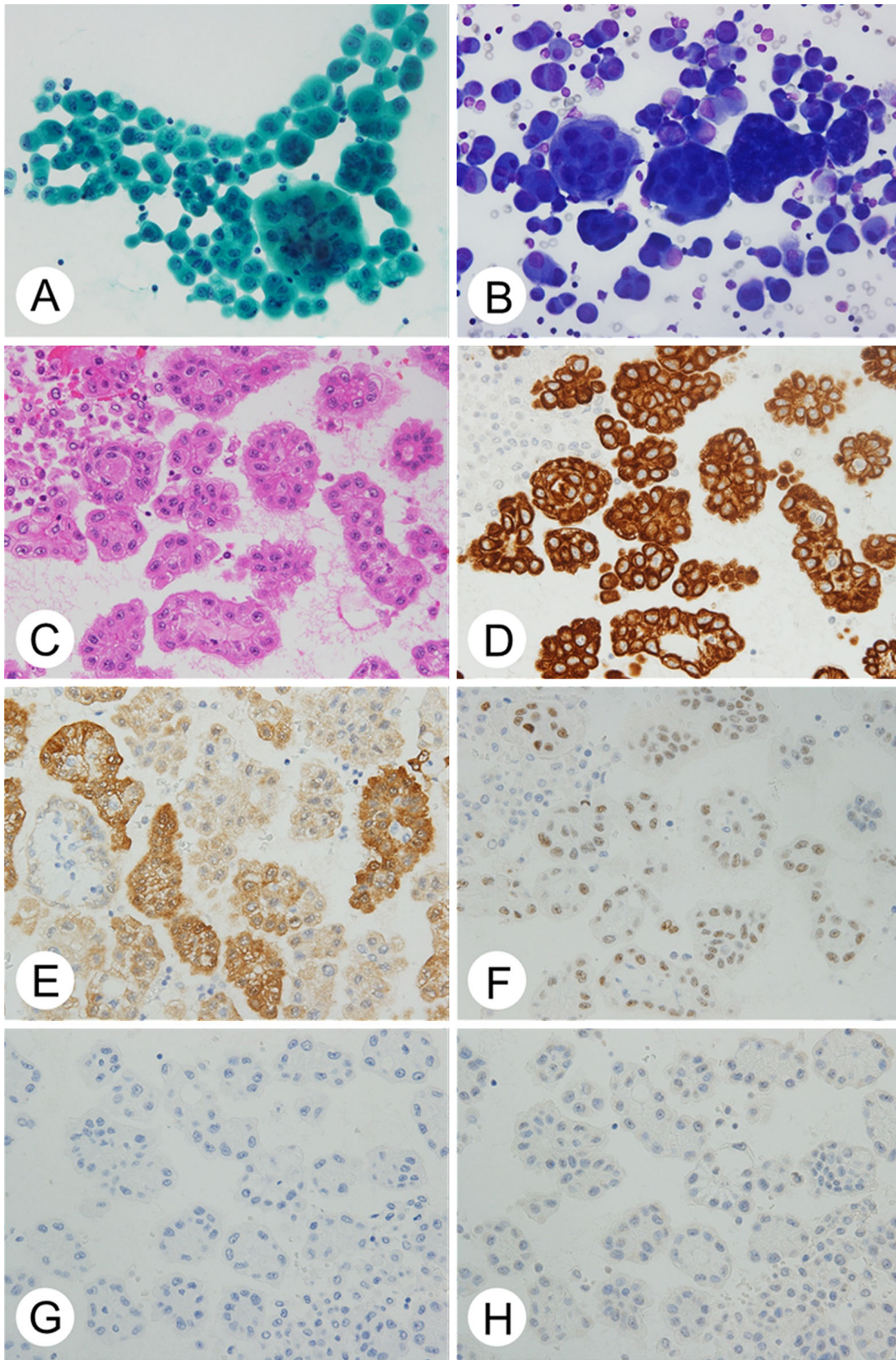


Figure 1. Pleural effusion cytology and cell block. Papanicolaou stain (A) and Giemsa stain (B) of pleural effusion smear cytology. Hematoxylin and eosin stain (C) and immunohistochemical staining of cell block sections for AE1/AE3 (D), calretinin (E), Wilms' tumor-1 (WT-1) (F), carcinoembryonic antigen (CEA) (G) and thyroid transcription factor-1 (TTF-1) (H).

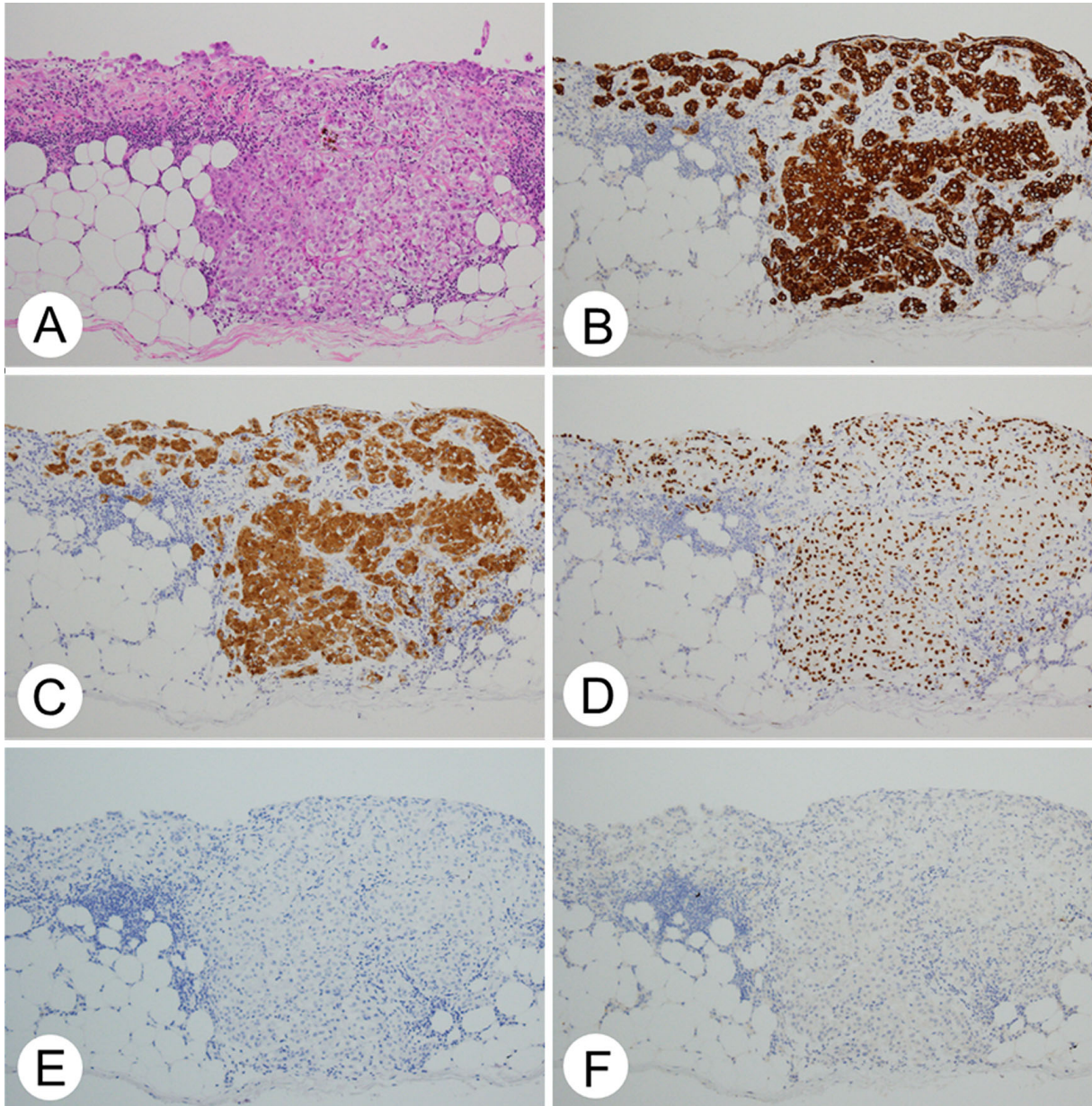


Figure 2. A pleural biopsy. Hematoxylin and eosin stain (A) and immunohistochemical staining for AE1/AE3 (B), calretinin (C), Wilms' tumor-1 (WT-1) (D), carcinoembryonic antigen (CEA) (E) and thyroid transcription factor-1 (TTF-1) (F).

なお、胸膜生検は細胞診を行った後、可及的速やか(概ね1カ月以内)に実施された。

解析方法

胸膜生検による病理組織診断結果とCBを併用した胸水細胞診による判定結果を比較し、胸水細胞診の診断精度(陽性的中率、陰性的中率、感度、特異度)を検討した。MPMの各組織型における感度についても検討した。

倫理的配慮

本研究は兵庫医科大学の倫理審査委員会にて承認を得

ている(承認番号#3155)。

結果

患者背景

本研究の対象25例の年齢中央値(範囲)は72歳(54~84歳)、男性21例であった。胸膜生検で25例のうち22例がMPM、2例が非特異的慢性胸膜炎、1例がIgG4関連疾患と病理組織診断された。

CBを併用した胸水細胞診では positive (malignant

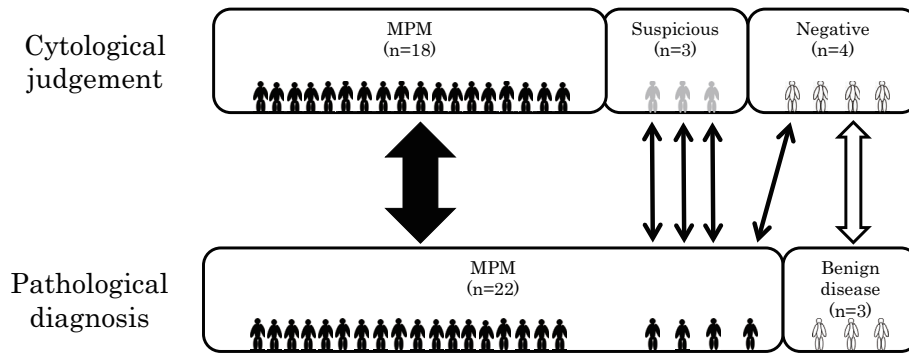


Figure 3. A comparison between the pathological diagnosis by a pleural biopsy and the cytological judgment of pleural effusion cytology with cell block. MPM: malignant pleural mesothelioma.

cells, 推定病変 MPM) と判定されたものが 18 例, 異型細胞を認めたが悪性細胞と断定できず suspicious (atypical cells) と判定されたものが 3 例, 悪性細胞や異型細胞を認めず negative と診断された症例が 4 例であった。

胸膜生検の診断結果と胸水細胞診の判定結果の比較

胸膜生検の診断結果と胸水検査の判定結果の比較は Figure 3 のとおりである。胸膜生検で MPM と診断に至った 22 例のうち, 18 例は胸水細胞診により positive (malignant cells, 推定病変 MPM) と判定されていた。残りの 4 例は胸水細胞診にて suspicious が 3 例, negative が 1 例であった。胸膜生検で MPM と診断されなかった 3 例はいずれも胸水細胞診では negative と判定されていた。以上より当研究における胸水細胞診の感度は 81.8% (18/22), 陽性的中率は 100% (18/18), 特異度は 100% (3/3), 陰性的中率は 42.9% (3/7) であった。

偽陰性となった 4 例のうち negative であった 1 例は, 上皮型であったが組織学的所見において中皮腫細胞が胸膜表層に存在していなかった。また suspicious の 3 例のうち 2 例は上皮型であったが, negative の症例と同様に中皮腫細胞は胸膜深層を中心に存在し, 表層にはほとんど認めなかった。また残りの 1 例は二相型であった。

組織型については, MPM であった 22 症例のうち上皮型は 19 例, 二相型は 3 例, 肉腫型は 0 例であった。上皮型 19 例と二相型 3 例における CB を併用した胸水細胞診の感度はそれぞれ 89.5% (17/19), 66.7% (2/3) であった。

考 察

当院で臨床経過や画像所見により MPM が疑われ, 胸膜生検を行った 44 例のうち生検前に CB を併用した胸水細胞診が行われていた 25 例を対象として, 病理組織診断の結果と胸水細胞診の判定結果を比較したところ, CB を併用した胸水細胞診による診断精度は感度 81.8%, 特

異度 100%, 陽性的中率 100% であった。特異度と陽性的中率が 100% であったことは, MPM 診断において CB を併用した胸水細胞診は極めて信頼性が高い診断法であると考えられる。

胸水細胞診で診断が可能であれば, 様々な利点がある。第一は, 胸膜生検を行わないため治療開始までの期間が短縮されることである。MPM は予後不良の悪性腫瘍であるため早期治療は予後の改善に寄与すると考えられる。第二は, 診断の低侵襲化である。胸水採取のための胸腔穿刺は胸膜生検と比べて侵襲性は極めて低く, 複数回行うことも可能である。第三は, 診断に伴う腫瘍の創部皮下浸潤の頻度を抑えられることである。MPM は局所浸潤性が非常に高く, 針生検や胸膜生検の創部の皮下に腫瘍が浸潤するが,⁸ 生検部皮下組織への腫瘍浸潤の頻度は胸膜生検よりも胸腔穿刺の方が低いと報告されている。⁹ このような理由から, CB を活用して胸水細胞診で診断が確定できるようになれば治療成績の向上に寄与する可能性が高い。

本研究の解析対象となった MPM 22 例の組織型は, 上皮型 19 例, 二相型 3 例で, 肉腫型 0 例であった。MPM では上皮型が最も多く胸水貯留をきたしやすいので,² CB を併用した胸水細胞診は多くの MPM (特に上皮型) の診断に極めて有用であると考えられる。一方, 肉腫型では胸水が貯留することは少なく, 胸水細胞診そのものが肉腫型の診断に適さないと考えられる。事実, 症例集積期間に胸膜生検が行われ, 4 例が肉腫型と診断されたがいずれも胸水は認めず胸水細胞診は行われていなかった。

本研究で胸水細胞診が偽陰性となった症例を 4 例認めた。そのうち 3 例は胸膜生検では上皮型との診断に至ったが, いずれも胸膜の深層を中心に中皮腫細胞が増殖しておりそれより浅層ではフィブリンなどの器質化組織が形成されていたため, 腫瘍細胞が胸水に出現しにくかつ

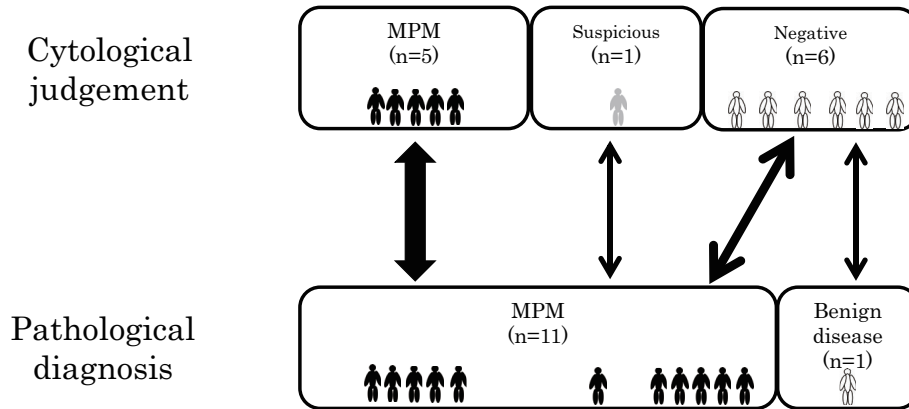


Figure 4. A comparison between the pathological diagnosis by a pleural biopsy and the cytological judgment of pleural effusion cytology without cell block. MPM: malignant pleural mesothelioma.

たと推察される。また二相型の症例においても肉腫成分を有するため、胸水中にこぼれた中皮腫細胞数が少なかったと思われる。このように胸水中に異型細胞の出現しにくい症例において胸水細胞診は偽陰性となりやすく、検査結果の解釈には十分な注意が必要である。

近年、MPMの遺伝子異常を反映して発現消失するタンパク質としてBAP1やMTAPが報告されている。BAP1抗体¹⁰やMTAP抗体¹¹はCBにも利用できることから、これらの抗体を用いた免疫組織化学的染色をCBに活用することで、良悪性の診断精度の向上が期待される。^{12,13} 本研究の症例蓄積期間に、胸水細胞診が胸膜生検に先行して行われていたもののCBが含まれていなかったものが12例存在した。12例の胸水細胞診の結果と胸膜生検の診断の相関図をFigure 4に示す。胸水細胞診で偽陰性となった6例(suspiciousが1例、negativeが5例)のうち4例は胸腔内に炎症を合併していたため、胸水中の細胞は炎症細胞が中心であったため、診断が困難であったと推察された。また残りの2例は肉腫型であったため診断が困難であったと推察された。このためCBに良悪性マーカー(BAP1抗体、MTAP抗体)を加えた免疫組織化学的染色を加えてCBの有用性を検討することが重要と考えられた。このために、現在、我々は複数施設と多施設前向き臨床試験「胸水検体による悪性胸膜中皮腫確定診断の可能性確認試験：MesoCyto study UMIN：000038709」を進めている。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

REFERENCES

1. 日本肺癌学会, 編集. 肺癌診療ガイドライン 2018年版. 金原出版; 2018.
2. Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, Allen TC, Attanoos RL, Beasley MB, et al. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142:89-108.
3. 石綿・中皮腫研究会, 日本中皮腫研究機構, 日本肺癌学会, 編集. 中皮腫瘍取扱い規約. 第1版. 金原出版; 2018.
4. 日本肺癌学会, 編集. 悪性胸膜中皮腫細胞診断の手引き. 第1.0版. 2017. https://www.haigan.gr.jp/modules/guideline/index.php?content_id=31
5. 日本肺癌学会, 編集. 悪性胸膜中皮腫病理診断の手引き. 第1.0版. 2013.
6. Woolhouse I, Bishop L, Darlison L, De Fonseca D, Edey A, Edwards J, et al. British Thoracic Society Guideline for the investigation and management of malignant pleural mesothelioma. *Thorax.* 2018;73(Suppl 1):i1-i30.
7. Hashimoto M, Sato A, Kuroda A, Nakamura A, Nakamichi T, Kondo N, et al. Clinical feature of diagnostic challenging cases for pleural biopsy in patient with malignant pleural mesothelioma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2020;68:820-827.
8. Kawaguchi K, Taniguchi T, Usami N, Fukui T, Ishiguro F, Nakamura S, et al. FDG PET/CT is useful for detecting infiltration to the port site in patients with malignant pleural mesothelioma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2014; 62:157-162.
9. Agarwal PP, Seely JM, Matzinger FR, MacRae RM, Peterson RA, Maziak DE, et al. Pleural mesothelioma: sensitivity and incidence of needle track seeding after image-guided biopsy versus surgical biopsy. *Radiology.* 2006;241:589-594.
10. Andrici J, Sheen A, Sioson L, Wardell K, Clarkson A, Watson N, et al. Loss of expression of BAP1 is a useful adjunct, which strongly supports the diagnosis of mesothelioma in effusion cytology. *Mod Pathol.* 2015;28:1360-1368.
11. Chapel DB, Schulte JJ, Berg K, Churg A, Dacic S, Fitzpatrick C, et al. MTAP immunohistochemistry is an accurate and reproducible surrogate for CDKN2A fluo-

- rescence in situ hybridization in diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Mod Pathol*. 2020;33:245-254.
12. Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, Kawahara K, et al. Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: Comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer*. 2017;104:98-105.
 13. Kinoshita Y, Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, et al. A combination of MTAP and BAP1 immunohistochemistry in pleural effusion cytology for the diagnosis of mesothelioma. *Cancer Cytopathol*. 2018; 126:54-63.