

平成24年度

中皮腫の診断補助キットと診断アルゴリズムの開発

株式会社パソロジー研究所

(1) 研究課題

本研究開発は、中皮腫診断の標準化に向けてのものであり、診断を容易にするために、標準化されたマーカーを免疫染色でチェックする診断補助キットおよび診断アルゴリズムの開発を目的としている。

- ①中皮腫症例 20 例、良性の中皮組織 30 例、肺腺がん 50 例、子宮体癌 30 例、卵巣癌 30 例を網羅する組織の収集と組織アレイの作製
- ②染色による候補マーカー抗体の感受性と特異性の検討
- ③カクテル抗体の組み合わせの選定
- ④カクテル抗体の混和条件、染色条件の検討

以上の4つの課題について検討を行う。

最終的に ①良性 vs. 悪性カクテル、②中皮腫 vs. 癌(胸腔)、③中皮腫 vs. 癌(腹腔)

の3種のカクテル抗体キットを作製することを予定した。

実施項目	具体的内容と参加機関・個人の役割分担												
1.症例選択	組織アレイ用の症例を選択する(富山大学)												
2.組織アレイ作製・染色	組織アレイブロック作製、組織アレイの免疫染色(パソ研)												
3.組織アレイ評価・解析	免疫染色した組織アレイの評価・解析(富山大学)												
4.カクテル抗体デザイン	カクテル抗体のデザイン(富山大学)												
5.カクテル抗体条件設定	カクテル抗体の染色条件設定、染色画像の解析(パソ研)												
6.カクテル抗体評価	カクテル抗体の性能評価(富山大学)												
7.キット化	カクテル抗体のキット化(パソ研)												
実施年・月 実施項目	H24 7	8	9	10	11	12	H25 1	2	3	4	5	6	7
1.症例選択							→						
2.組織アレイ作製・染色													→
3.組織アレイ評価・解析													→
4.カクテル抗体デザイン													→
5.カクテル抗体条件設定													→
6.カクテル抗体評価													→
7.キット化													→
実施年・月 実施項目	H25 8	9	10	11	12	H26 1	2	3	4	5	6	7	
1.症例選択													
2.組織アレイ作製・染色											→		
3.組織アレイ評価・解析											→		
4.カクテル抗体デザイン												→	
5.カクテル抗体条件設定													→
6.カクテル抗体評価													→
7.キット化													→

## (2) 研究の実施内容及び成果

### ①検討症例の組織アレイ作製

検討症例として、中皮腫、良性中皮組織、肺腺癌、子宮体癌、そして卵巣癌症例を各々収集して組織アレイを作製する計画であったが、当初に目標とした症例数の確保、特に良性中皮組織の収集が困難にて、例数を減らし日常の病理診断で形態的に中皮腫と鑑別困難な診断症例を厳選し組織アレイを作製した。

症例数は、各々以下の通りである。なお、組織 **heterogeneity** を評価する必要性から、中皮腫、良性中皮細胞ブロック、非小細胞肺癌低分化型はスパイラルアレイ標本とした。

#### 【悪性中皮腫 13例】

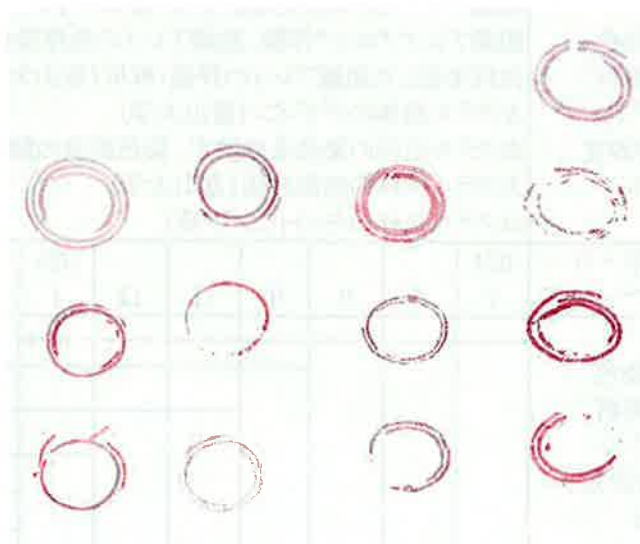
上皮型 7例

肉腫型 4例

二相型 2例

上皮型中皮腫と低分化扁平上皮癌の診断困難例 1例

[アレイ標本]



#### 【良性中皮細胞ブロック 3例】

胸腹水細胞診にて良性と診断された材料 3例

[アレイ標本]



【非小細胞肺癌低分化型 7例】

- 低分化腺癌 2例
- 低分化腺扁平上皮癌 2例
- 大細胞癌 1例
- 多形性癌 1例
- 肉腫様癌 1例

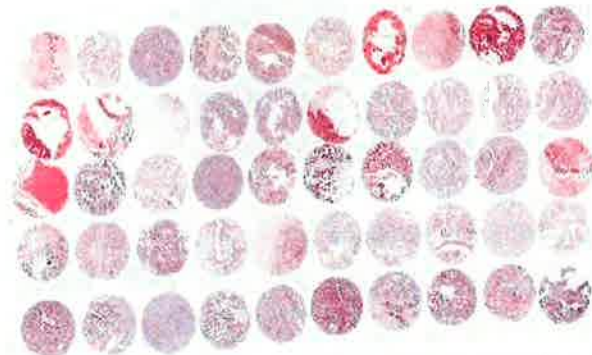
【アレイ標本】



【子宮体癌、卵巣癌 50例】

- 類内膜腺癌 15例
- 漿液性腺癌 16例
- 明細防腺癌 11例
- 粘液癌 8例

【アレイ標本】



②免疫染色による候補マーカー抗体の感受性と特異性の検討

計画書で挙げた候補マーカー抗体に PAX8, CD146, IMP3, TERT を加えた 14 種類について免疫染色し、その結果をスコア化した。

・候補マーカー抗体

WT-1, TTF-1, p53, p63, Ber-EP4, Calretinin, EMA, D2-40, Glut-1, CEA  
PAX8, CD146, IMP3, TERT,

・染色結果のスコアリング方法

・染色結果のスコアリング方法

**Distribution**

Rxpression ratio (%)	Distribution score
0	0
1	1
10	10
20	20
30	30
40	40
50	50
60	60
70	70
80	80
90	90
100	100

**Intensity**

Rxpression level	Intensity score
No expression	0
Weak	1
Moderate	2
Marked	3

**Total score = [Distribution score] multiplied by [Intensity score]**

**Evaluation**

Evaluation	Total score	
Negative	0 - 50	
Positive	60 - 100	
	120 - 200	
	210 - 300	

**Scoring table and evaluation**

(エクセル：Scoring data 表、クラスター評価 参照)

・染色結果のスコアリング表 (別 Excel ファイル)

③カクテル抗体の組み合わせの選定

Scoring 表よりクラスター評価を行い、カクテル抗体の組み合わせを 3 種類に絞った

(1)中皮腫 陽性カクテル：WT-1 と D2-40 の 2 種

(2)中皮腫 陰性カクテル：TTF-1 と PAX8 と BerEP4 と CEA の 4 種

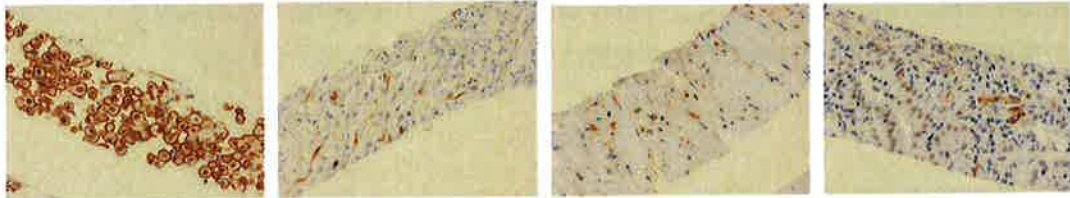
(3)反応性中皮との鑑別カクテル：p53 と IMP3 と CD146 の 3 種

以上、(1)～(3)の 3 種類のカクテル抗体を 1 セットとする。

## ・染色例

### (1) 中皮腫 陽性カクテル

上皮型中皮腫では強く発現するが、肉腫型、線維形成型では部分的な陽性像となる。



上皮型中皮腫

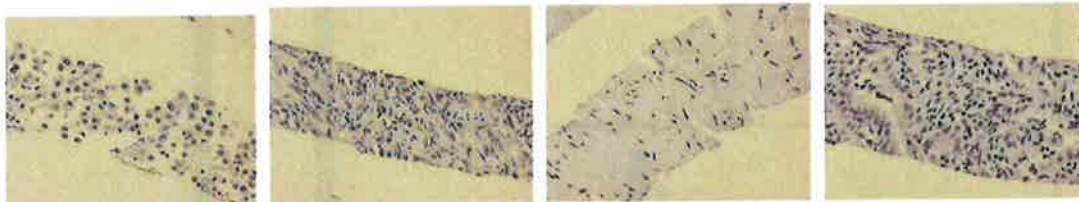
肉腫型中皮腫

線維形成型中皮腫

二相型中皮腫

### (2) 中皮腫 陰性カクテル

中皮腫のいずれの型（上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型）も陽性像は見られない。



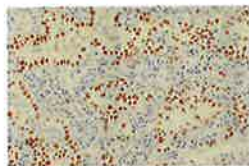
上皮型中皮腫

肉腫型中皮腫

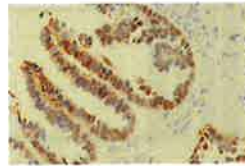
線維形成型中皮腫

二相型中皮腫

一方、癌腫では陽性を示す



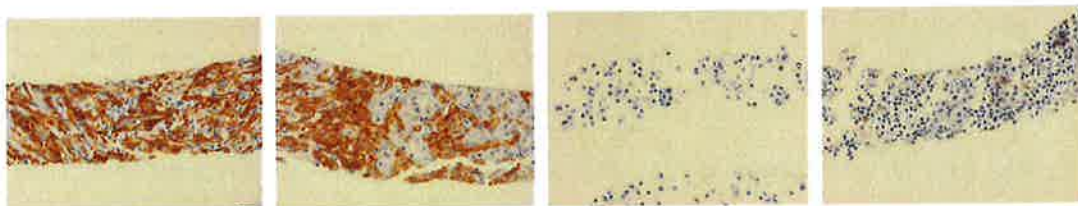
肺癌 (TTF-1 & Ber-EP4)



卵巣癌 (PAX8 & Ber-EP4)

### (3) 反応性中皮との鑑別カクテル

中皮腫では強い陽性像が見られるのに対し、反応性中皮細胞では陽性像は全く見られない。



肉腫型中皮腫

二相型中皮腫

反応性中皮細胞

反応性中皮細胞

最適条件でカクテル化した各々抗体（陽性カクテル抗体、陰性カクテル抗体、良悪鑑別カクテル抗体）で、中皮腫と反応性中皮の組織を染色した結果、中皮腫のいずれの型（上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型）にも陽性カクテル抗体、あるいは鑑別カクテル抗体の陽性像を認めた。一方、いずれの型の中皮腫も陰性カクテル抗体は染まらず、また、反応性中皮も鑑別カクテル抗体に染まらなかった。

### (3) 今後予想される効果

今日、中皮腫の発生と死亡者数が増加の一途をたどるなかで（下グラフ）、医療機関が中皮腫の診断に遭遇する機会は益々増えていく。今回作製に成功した中皮腫診断のためのカクテル抗体キットは、医療機関における病理診断のための要望に大きく貢献すると考えられる。

