

術中迅速細胞診における 迅速 Liquid-based cytology 法の有用性 — 肺腫瘍の穿刺吸引細胞診について —

窪田 裕美*	水野 彩乃	坂本 真吾
本吉 知里	三好 陽子	池田 みか
門屋 孝志	古本 好江	高石 治彦
西山 政孝**	飛田 陽*	大城 由美

要 旨

Liquid-based cytology (以下 LBC 法) はアーチファクトが少なく、集細胞性の高い標本作製を可能とした優れた細胞診標本作製法である。当病理部門では、術中迅速細胞診において標本作製時間を短く改良した LBC 法 (以下迅速 LBC 法) を実施しており、その有用性について検討した。2011 年 1 月から 2015 年 10 月の期間に、肺腫瘍の術中迅速細胞診として提出された穿刺吸引検体のうち、細胞診断で鑑別困難および悪性・悪性疑いと判定された 36 例を対象として従来法と迅速 LBC 法の標本作製し、異型細胞量、細胞診判定、標本作製および鏡検に要する時間について比較検討した。異型細胞量は、迅速 LBC 法が優位であったものが 24 例 (66.7%)、同等は 12 例 (33.3%)、従来法が優位であったものは認めなかった。細胞診判定では両者の判定が一致した症例は 31 例 (86.1%) で、不一致例の 5 例 (13.9%) は、従来法より迅速 LBC 法で異型細胞の検出率が高かった。標本作製および鏡検に要する平均時間は従来法が約 5 分 7 秒、迅速 LBC 法が約 11 分 1 秒で、迅速性は従来法が優れていた。迅速 LBC 法は集細胞性や異型細胞の検出率が高いことが確認できた。

はじめに

細胞診において、SurePath™ (日本ベクトンディッキンソン社：以下 BD 社) による Liquid-based cytology (以下 LBC 法) はアーチファクトが少ないため観察しやすく、集細胞性の高い標本作製が可能な優れた方法であり、多くの領域で利用されてきている^{1)~5)}。当病理部門では、2010 年より耳鼻科領域、主に甲状腺の穿刺吸引細胞診において LBC 法の導入を開始し、現在では婦人科、尿、体腔液、乳腺検体などに应用範囲を広げている。また、新たな取り組みとして標本作製時間を短く改良した LBC 法 (以下迅速 LBC 法) を術中迅速細胞診で実施している。今回は術中迅速細胞診において、従来の直接塗抹標本と迅速 LBC 標本を比較し、迅速 LBC 法の有用性について検討したので報告する。

対象および方法

2011 年 1 月から 2015 年 10 月の期間に、肺腫瘍の術中迅速細胞診として提出された穿刺吸引検体のうち、細胞診断で鑑別困難および悪性・悪性疑いと判定された 36 例を対象とし、以下の方法で標本作製したのに関して、レトロスペクティブに検討を

*松山赤十字病院 病理診断科部

**松山赤十字病院 検査部

行った。なお、症例内訳は原発性肺癌 32 例（腺癌 23 例，扁平上皮癌 7 例，大細胞神経内分泌癌 2 例），転移性肺癌 4 例であった。

従来法は 22G 注射針にて穿刺吸引された検体を直接スライドガラスに吹き付け，合わせ法にて塗抹，あるいは液体成分が多い場合は 3,000 rpm 2 分間遠心後，引きガラス法にて塗抹し，標本を 2 枚作製した。1 枚は乾燥固定後に Diff-Quick 染色（以下 DQ 染色）を，1 枚は 95% アルコール固定後に迅速パパニコロウ染色（以下 Pap 染色）を行った。

迅速 LBC 法は BD 社の用手法プロトコルを一部迅速用に改良して標本作製した（Fig. 1）。LBC 法の細胞塗抹原理は細胞の荷電・比重を利用した自然沈降法である（Fig. 2）。従来法による検体吹き付

け処理後の注射器を，5～10 ml の CytoRich™Red（BD 社非婦人科検体用 LBC 固定液）で 3～4 回洗浄，残存細胞成分を洗い出し，洗浄液を 3,000 rpm 2 分間遠心後，上清を廃棄，沈渣に精製水を約 300 μl 加え攪拌したものを検体とした。BD™ セトリングチャンバーをセットした BD シュアパス™ プレコートスライドに検体を滴下，2 分間静置し，細胞の塗抹を行った。細胞の塗抹時間に関しては推奨の 10 分と比較して，細胞所見・細胞数において診断に影響するような大きな差異は見られなかったため 2 分を適正塗抹時間と設定した（Fig. 3）。チャンバー内の余分な上清を除去し，100% エタノール約 1 ml を静かに加え洗浄後，従来法と同様の Pap 染色を行った。

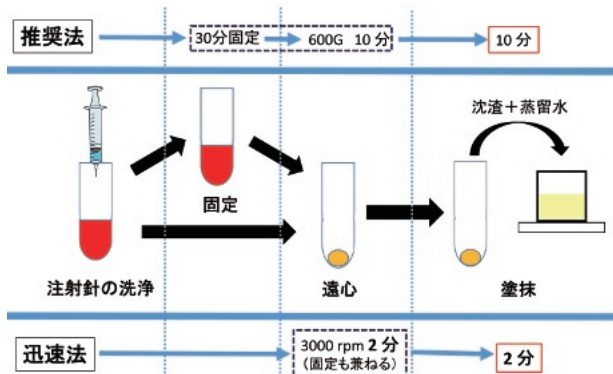


Fig. 1 BD 社推奨用手法プロトコルと 当院迅速用プロトコル

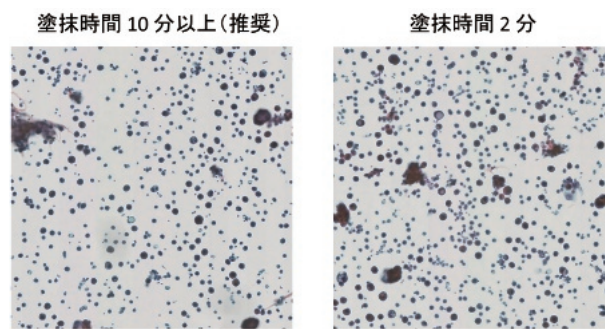


Fig. 3 塗抹時間における細胞像の比較 写真は全て Pap 染色×10

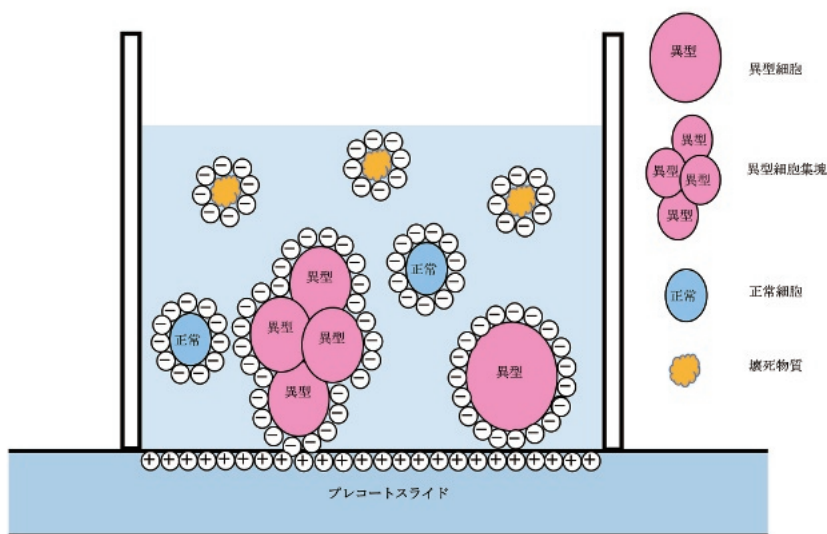


Fig. 2 細胞塗抹原理 (LBC 法, SurePath™)
 比重の重い異型細胞を優先的にスライド面に吸着させる
 プレコートスライド：陽イオンコーティングしたスライドガラス

この従来法と迅速LBC法について、以下の3項目を比較検討した。

1. 異型細胞量

塗抹標本中の異型細胞量をカウントし、以下のよう
に分類した。0：異型細胞なし、1+：1～5ヶ
所、2+：6～10ヶ所、3+：11～15ヶ所、4+：
16～20ヶ所、5+：21ヶ所以上。さらに、1段階
以上差を認めた場合に優位な標本とし、疾患別に評
価した。なお従来法は標本作製過程で細胞剥離が少
ないとされているDQ染色を用いた。

2. 細胞診判定

各標本について、「正常あるいは良性」、「鑑別困
難」、「悪性疑い」、「悪性」の4段階判定を行った。
なお従来法はDQ染色とPap染色を総合して判定
した。

3. 標本作製および鏡検の2工程に要した時間

染色については、DQ染色は、DQ固定液5秒間、
I液10秒間、II液20秒間、水洗5回、風乾、合計約
1分間で染色した。Pap染色は、水洗10回、ギル
ヘマトキシリン液1分間、水洗10回、1%塩酸アル
コール5回、温水水洗10秒間、95%エタノール
3回、OG-6液30秒間、95%エタノール3回×3槽、
EA-50液1分間、100%エタノール5回×4槽、キシ
レン5回×4槽、封入、合計約5分間で染色した。
鏡検時間は顕微鏡観察のみに要した時間を測定した。

結 果

1. 異型細胞量 (Table 1)

迅速LBC法により多くの異型細胞を認めた症例
は24例(66.7%)で、従来法と迅速LBC法が同等

Table 1 従来法と迅速LBC法における異型細胞量の比較

		迅速LBC法 >従来法*	同等*	従来法 >迅速LBC法*
原発性肺癌	腺癌	14(60.9%)	9(39.1%)	0
	扁平上皮癌	6(85.7%)	1(14.3%)	0
	大細胞神経 内分泌癌	1(50.0%)	1(50.0%)	0
転移性肺癌		3(75.0%)	1(25.0%)	0
計		24(66.7%)	12(33.3%)	0

*従来法と迅速LBC法を比して、異型細胞量分類に1段階以上差が生じた症例数(割合)と同等であった症例数(割合)

であったものは12例(33.3%)、従来法が優位であ
った症例は認めなかった。特に原発性肺扁平上皮癌お
よび転移性肺癌では迅速LBC法が優位であった症
例が7例中6例(85.7%)、4例中3例(75.0%)
と検出率が高い傾向であった。出血性検体や多量の
壊死物を伴う原発性肺扁平上皮癌および転移性肺癌
においてFig.4およびFig.5に示すように、従来
法に比べ迅速LBC法の背景が清明で観察しやす
く、迅速LBC法でより多くの異型細胞が青点、矢

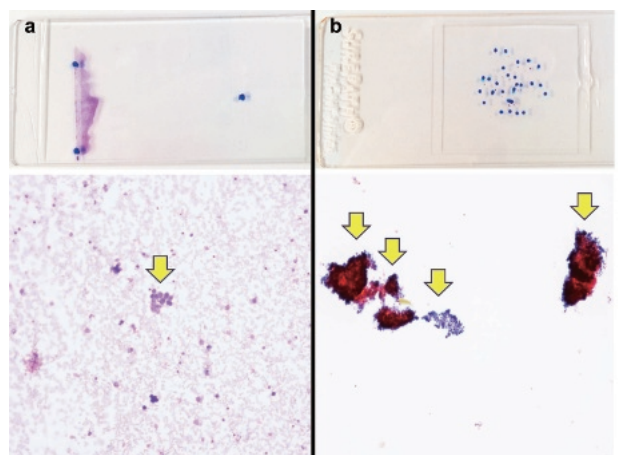


Fig.4 原発性肺腺癌症例の出血性検体。異型細胞(矢
印)は迅速LBC法でより多く認められた。
a：従来法(DQ染色)スライドガラスのマクロ写真
(上)、顕微鏡写真×10(下)
b：迅速LBC法 スライドガラスのマクロ写真
(上)、顕微鏡写真×10(下)

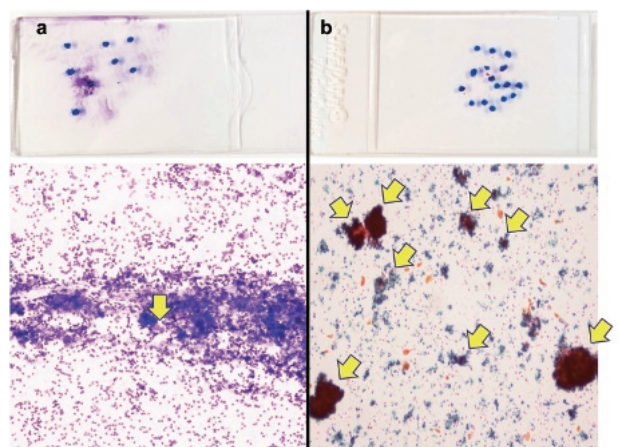


Fig.5 原発性肺扁平上皮癌症例の壊死性検体。異型細
胞(矢印)は迅速LBC法でより多く認められた。
a：従来法(DQ染色)スライドガラスのマクロ写真
(上)、顕微鏡写真×10(下)
b：迅速LBC法 スライドガラスのマクロ写真
(上)、顕微鏡写真×10(下)

印部において検出できた。

2. 細胞診判定

判定が一致した症例は31例(86.1%)であった。不一致の5例(13.9%)は、全てが迅速LBC法で異型細胞が多く観察され、判定グレードが上昇した(Table 2)。症例20では、従来法のPap染色(Fig. 6a)とDQ染色(Fig. 6b)には数個からなる細胞小集塊が1ヶ所ずつしか観察されず、さらに血液に被覆されていたため細胞所見も不明瞭で良悪の判定は

Table 2 従来法と迅速LBC法における判定不一致例の内容

症例	従来法		迅速LBC法		判定の昇降
	判定	異型細胞量	判定	異型細胞量	
18	悪性疑い	1+	悪性	4+	↑
20 (Fig. 6)	鑑別困難	1+	悪性	2+	↑
22	鑑別困難	1+	悪性	5+	↑
23	正常および良性	0	鑑別困難	1+	↑
35	鑑別困難	1+	悪性	5+	↑

*判定の昇降は従来法標本の判定を基準とする

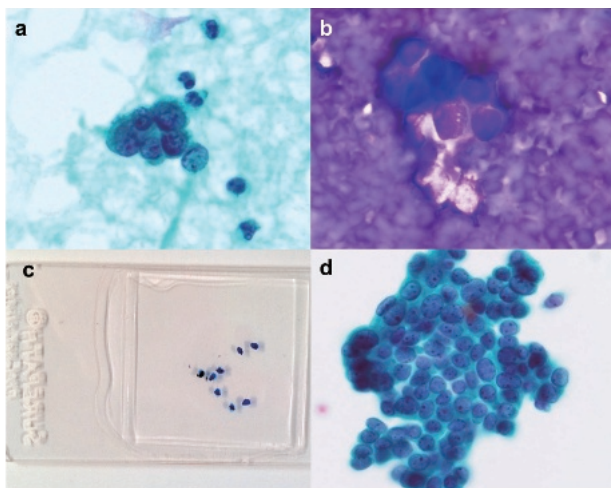


Fig. 6 迅速LBC法が悪性判定に有用であった症例(症例20 原発性肺腺癌)

- a: 従来法(Pap染色×60)出血性背景、1ヶ所にのみ認められた異型細胞小集塊。
 b: 従来法(DQ染色×60)異型細胞小集塊は血液に被覆され、細胞所見が不明瞭。
 c: 迅速LBC法 ガラス標本8か所(青点)で異型細胞を検出。
 d: 迅速LBC法(×60) 清明な背景に重積性を示す異型細胞集塊が見られる。腺癌と診断。

困難であった。迅速LBC法(Fig. 6c, 6d)では赤血球が除去された清明な背景に、小～中型の異型細胞集塊を8ヶ所で検出し、容易に腺癌と診断できた。

3. 標本作製および鏡検の2工程に要した時間 (Table 3)

標本作製に要した時間は、従来法ではDQ染色が約1分、Pap染色が約6分、迅速LBC法では約9分であり、従来法のDQ染色が短時間で優れていた。しかし鏡検に要した時間は、従来法ではDQ染色が平均3分57秒、Pap染色が平均3分3秒、迅速LBC法では平均2分1秒で、従来法の鏡検時間と比し、迅速LBC法では平均1.72倍と約2倍短縮化された。2工程の合計時間は、従来法ではDQ染色が約5分7秒、Pap染色が約9分3秒、迅速LBC法が約11分1秒であった。

Table 3 従来法と迅速LBC法における標本作製および鏡検に要する時間の比較

	従来法		迅速LBC法
	DQ染色標本	Pap染色標本	
固定・塗抹	10秒; 風乾	1分: 95%アルコール	2分+2分
染色	約1分	約5分	約5分
鏡検(n=36)	平均3分57秒	平均3分3秒	平均2分1秒
計	約5分7秒	約9分3秒	約11分1秒

考 察

当院の術中迅速細胞診は、主に胸水・胸腔洗浄液および肺腫瘍検体において、良悪の判定や組織型の推定などを目的に実施されている。その後の術式を決定する際に重要な役割を果たしているため、限られた時間と標本で正確な判定を行わなければならないプレッシャーは非常に大きく、よって診断精度だけでなく、いかに質の高い標本作製を行うかも重要なポイントである。LBC法は婦人科細胞診で普及し、現在では多くの非婦人科検体にも利用されているが、術中迅速細胞診へ応用した報告は少ない⁶⁾。当病理部門では、術中迅速細胞診において迅速LBC法を実施しており、その有用性について検討を行った。

異型細胞量の検討では、迅速LBC法が従来法より優れていた。従来法塗抹後に通常は廃棄されていた注射器の洗浄液で作製した残検体による標本であるにもかかわらず、このような結果を得たことは注目すべきである。これはまず迅速用に塗抹時間を短縮化した方法であっても、LBC法の高集細胞性と陽イオンコーティングガラスの強い接着力が十分に発揮されたからだと考えられた。また特に出血性および壊死性検体において、迅速LBC法の優位性がより顕著に示された。従来法は異型細胞が赤血球や壊死物と競合し、あるいは被覆されることにより異型細胞塗抹量の過少や不明瞭化が生じるが、迅速LBC法はLBC固定液であるCytoRich™ Redの持つ溶血作用により赤血球の多くが塗抹前に除去され、さらに比重の軽い細胞破砕物などの壊死物は上皮細胞吸着後の残りの隙間にしか塗抹されないため (Fig. 2), 異型細胞への被覆による不明瞭化が回避されると考えられている。さらにLBC法では、熟練した技術を要しないため、個人差を生じさせず、均質な標本作製が可能であり⁷⁾、その点も異型細胞量が迅速LBC法で高い検出率となった理由と考えられた。

細胞診判定の比較検討では、5例 (13.9%) において、従来法では異型細胞量が少なく、あるいは認められず低判定となったものが、迅速LBC法では多くの異型細胞が見られ、容易により悪性を疑うことができ、判定に有用であった。迅速LBC法は数の力で低判定を減らすことが期待できた。

標本作製および鏡検の2工程に要する時間においては、迅速LBC法は鏡検面積が1.33 cm²と従来法 (平均5.70 cm²) の約1/4で、鏡検時間の短縮が図れるものの、標本作製に時間を要するため2工程の合計時間は約11分間で、従来法と比べて約2分の時間を要し、迅速性に若干劣った。ただし、日常の術中迅速細胞診で行われるダブルチェックや、報告書の作製時間を考慮した場合でも、手術室への結果報告を30分以内に行うことが可能であり、術中迅速細胞診においては許容範囲内と考えられる。

以上のことより、迅速LBC法は術中迅速細胞診において有用な方法である。一方、迅速性・簡便性においては従来のDQ染色による標本作製法が適し

Table 4 従来法と迅速LBC法の比較

	従来法		迅速LBC法 ◎ ○ △ × ↑ 良好 ↓ 不良
	DQ染色	Pap染色	
迅速性	◎	○	△
簡便性	◎	○	△
集細胞性	○ (症例によっては△)	△ (症例によっては×)	◎
細胞接着性	○	△	◎
背景の清明さ	○ (症例によっては△)	○ (症例によっては△)	◎
均質な標本作製	△	△	◎

ており^{8),9)}、またギムザ染色にほぼ類似したDQ染色が造血系腫瘍の診断には必須であることは周知のことである。よってお互いの利点・問題点 (Table 4) を把握し、併用することが迅速で精度の高い診断につながり、最善の方法である。術中迅速細胞診において迅速LBC法併用は有用であり、診断精度の向上が期待できた。

文 献

- 1) 原田美香ほか：子宮内膜細胞診における従来法標本とLBC法標本の比較検討, 愛媛県臨床検査技師会誌 **32**: 55-61, 2013.
- 2) 平紀代美ほか：2004年WHO分類に基づく病理組織診断による尿細胞診評価の試みおよびLiquid-based cytology (LBC) 標本と従来法標本の比較研究, 日本臨床細胞学会雑誌 **51**: 315-322, 2012.
- 3) 中島真奈美ほか：Liquid-based cytology (LBC) 法の体腔液細胞診への応用－従来法標本とLBC標本における判定結果の比較－, 日本臨床細胞学会北海道支部会報 **17**: 15-18, 2008.
- 4) 畠 榮ほか：乳腺穿刺吸引細胞診における従来法とLBC法の細胞の見方－利点ならびに問題点について－, 臨床検査 **58**: 685-692, 2014.
- 5) 前田智治ほか：甲状腺穿刺細胞診における従来法と液状処理細胞診 (LBC) の比較について, 日本臨床細胞学会雑誌 **49**: 108-111, 2010.
- 6) 平紀代美ほか：Liquid-based cytology の迅速診断応用への基礎的検討, 日本臨床細胞学会北海道支部会報 **15**: 9-12, 2006.
- 7) 南口早智子：LBCの利点と問題点, 臨床検査 **58**: 670-676, 2014.
- 8) 甲斐俊一ほか：乳癌におけるセンチネルリンパ節の術中迅速細胞診, 日本臨床細胞学会雑誌 **48**: 110-113, 2009.
- 9) 荒木邦夫ほか：未確診肺腫瘍に対する術中迅速細胞診の有用性, 日本臨床細胞学会雑誌 **47**: 81-85, 2008.

Advantages of a Rapid Liquid-based Cytology Method in the Intraoperative Rapid Cytology –Reviews on Fine-needle Aspiration Cytology for Pulmonary Mass–

Hiromi KUBOTA*, Ayano MIZUNO, Shingo SAKAMOTO, Chisato MOTOYOSHI,
Yoko MIYOSHI, Mika IKEDA, Koji KADOYA, Yoshie FURUMOTO, Haruhiko TAKAISHI,
Masataka NISHIYAMA**, Akira HIDA* and Yumi OSHIRO

*Department of Pathological Diagnosis, Matsuyama Red Cross Hospital

**Department of Clinical Laboratory, Matsuyama Red Cross Hospital

Background: Liquid-based cytology (LBC) is an established and remarkable cytopreparation method minimizing operator-dependent variation and enabling higher cell collection rates. The MRCH Pathological Department has introduced a rapid LBC method, an upgraded LBC technique, which allegedly contributes to a more time-efficient preparation. We reviewed the advantages of the rapid LBC method.

Methods: We selected 36 pulmonary mass cases, which had been cytodiagnosed with ‘diagnostic obscurity’, ‘malignancy’ or ‘malignancy-suspected’, from the samples taken through the fine-needle aspiration cytology (FNAC) method for intraoperative rapid cytology conducted during the period from January 2011 to October 2015. We made preparations of these samples using both the rapid LBC method and the conventional one, in order to compare the quantity of atypical cells detected, the accuracy of cytological diagnosis, and the average time for making preparations and microscopic examinations.

Results: In regarding to the quantity of atypical cells detected, the rapid LBC technique was superior in 24 cases (66.7%), the two methods showed equivalent detection rates in 12 cases (33.3%), and the conventional method’s superiority was not shown in any cases. In a comparison of sensitivity towards cytological diagnosis, the two methods generated the same diagnostic results in 31 cases (86.1%), and different results in 5 cases (13.9%), in which the rapid LBC detected more atypical cells than the conventional one. Regarding the average time for preparations and microscopic examinations, the conventional method took approx. 5 min. and 7 sec. while the rapid LBC took approx. 11 min. and 1 sec. The difference in this comparison indicates that the conventional method is more time-efficient than the rapid LBC.

Conclusion: The rapid LBC method demonstrates its advantages both in cell collection and atypical cell detection.