

## 尿細胞診における液状化検体細胞診法と従来法の比較

曲 師 妃 春<sup>1</sup>      金 丸 紘 弓<sup>1</sup>      知 野 麻 依<sup>1</sup>      竹 内 正 喜<sup>1</sup>  
 長 尾 一 弥<sup>1</sup>      田 上 洋 平<sup>2</sup>      菊 地 智 樹<sup>2</sup>      小 幡 雅 彦<sup>2</sup>

Key Word: 尿細胞診, 従来法, 液状化検体細胞診法

### はじめに

尿細胞診は泌尿器科領域にとって、尿路腫瘍のスクリーニングから術後の経過観察まで幅広い目的で用いられる診断方法である。広く普及している要因として、尿(特に自然尿)は他の胸水や腹水などの穿刺が必要な液状検体と異なり、検体採取が容易で患者負担が少ないという利点がある。しかし広く行われている通常の標本作製では(以下、従来法)アルコール固定を用いるため、乾燥固定標本に比べガラス標本からの細胞剥離が少なからず見られ、診断に十分な量を得られない場合もある。このため、改良された標本作製方法が数多く提唱されている<sup>1-4)</sup>。

我々は、2015年5月より液状化検体細胞診法(Liquid Based Cytology法;以下、LBC法)を導入し、LBC法では上皮細胞や大型細胞集塊の塗抹量が増加する傾向が見られる事を昨年報告した<sup>5)</sup>。今回は尿細胞診に絞り、LBC法の導入効果について、尿路腫瘍の組織型別に詳細に検討した結果を報告する。

### 1. 方 法

当院の尿細胞診は、採取細胞を直接スライドガラスに塗抹し95%アルコール固定を行う直接塗抹法(従来法)と、LBC法を併用し標本作製を行っている。また細胞診断の報告様式には、陰性、異型細胞、悪性の疑い、悪性の4つのカテゴリーを用いている。

#### 1. 標本作製方法

尿検体に細胞剥離防止のための前処理液として、適量の牛アルブミン・食塩水<sup>6)</sup>を検体に添加し、半量を従来法、残りをLBC法に用いている。

##### (1)従来法

通常検体の場合、サクラファインテックジャパン株式会社のサイト・テック®セントリフュージを使用したオー

トスメア法を行い、塗抹面は14mm×14mmのものを採用している。スライドガラスは、武藤化学株式会社のコーティングスライドガラス NewシランIVを剥離防止のために使用している。また沈査物が多い場合は引きガラス法や、すり合わせ法による標本作製を行っている。

##### (2)LBC法

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社のBDシユアパス™液状処理細胞診システムのサイトリッチ™レッド保存液とその専用スライドガラスを採用し、手作業で標本作製を行う方法(以下、用手法)で標本作製を行っている。塗抹面は、直径13mmの円形となっている。

### 2. 比較方法

従来法とLBC法間で、細胞塗抹量と主な組織型の細胞像(尿路上皮癌、膀胱小細胞癌、前立腺癌(膀胱浸潤)、子宮頸部扁平上皮癌(膀胱浸潤))の比較を行った。

## II. 結 果

尿細胞診は婦人科子宮頸部(膣部・外陰部含む)細胞診について検体数が多く、2017年では全細胞診検体数の18%を占めている(図1)。当院でのLBC法導入前後の診断結果を比較したところ、2014年では異型細胞以上に該当する報告が1,021件中80件(約8%;内訳:異型細胞16件、悪性の疑い7件、悪性57件)であったのに対し、2017年では864件中132件(約15%;内訳:異型細胞26件、悪性の疑い18件、悪性88件)と増加していた。

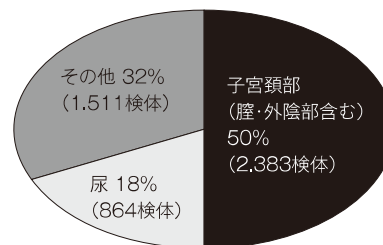


図1. 細胞診検体臓器別割合 (2017年)

旭川赤十字病院 医療技術部病理課<sup>1</sup> 病理診断科<sup>2</sup>

### Comparison between Liquid Based Cytology method and conventional method in urocytology

Kiharu MAGESHI<sup>1</sup>, Hiromi KANAMARU<sup>1</sup>, Mai CHINO<sup>1</sup>, Masayoshi TAKEUCHI<sup>1</sup>, Kazuya NAGAO<sup>1</sup>  
 Yohei TAGAMI<sup>2</sup>, Tomoki KIKUCHI<sup>2</sup>, Masahiko OBATA<sup>2</sup>

## 1. 細胞塗抹量の比較

塗抹された細胞量を比較すると、LBC法の方が従来法に比べ明らかに上皮細胞数が多かった(写真1:上段)。特に女性において背景に塗抹される扁平上皮細胞数は著増し、大型上皮細胞集塊も多く見られた(写真1:下段)。また炎症細胞が多い検体では上皮細胞が炎症細胞よりも多く塗抹され、なおかつ個々の細胞重積が起りにくかった(写真2:上段)。血性検体では、赤血球数が大幅に減少していた(写真2:下段)。

また2017年の陰性症例を除く132症例を見直した。診断に有意な細胞が塗抹されていた症例の割合をLBC法、従来法で比較したところ、LBC法優位65症例(49%)、LBC法と従来法が同等52症例(40%)、従来法優位15症例(11%)であった(図2)。

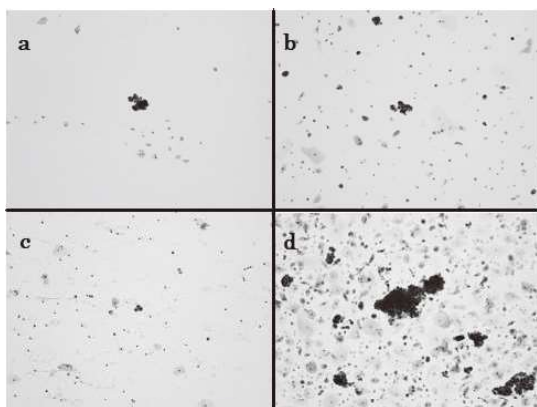


写真1: 塗抹量比較

上段(膀胱洗浄尿、男性) a:従来法 対物10倍、b:LBC法 対物10倍  
下段(自然尿、女性) c:従来法 対物10倍、d:LBC法 対物10倍

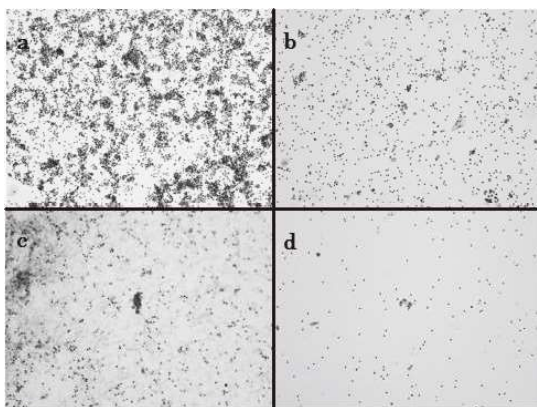


写真2: 塗抹量比較

上段(炎症細胞多量) a:従来法 対物10倍、b:LBC法 対物10倍  
下段(赤血球多量) c:従来法 対物10倍、d:LBC法 対物10倍

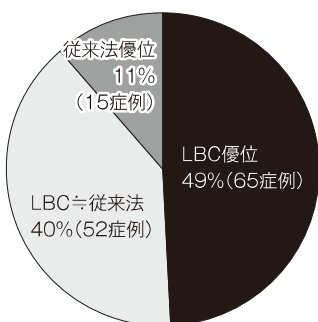


図2. 診断に有用な検体処理法の割合(2017年)

## 2. 主な組織型別の細胞像の比較(表1)

組織型	所見	従来法	LBC法
尿路上皮癌	核縁	肥厚	肥厚
	クロマチンパターン	粗大顆粒状	微細顆粒状
	核小体	-	明瞭
	細胞集塊(重積性)	あり	顕著
小細胞癌	クロマチンパターン	粗顆粒状	粗顆粒状
	核小体	-	明瞭
	細胞集塊(重積性)	-	顕著
前立腺腺癌	核縁	肥厚	-
	クロマチンパターン	細顆粒状	細顆粒状
	核小体	明瞭	明瞭(鮮明)
	細胞集塊	大型シート状	小型集塊状
	核偏在傾向	あり	突出傾向強
扁平上皮癌	角化型細胞出現	あり	あり
	基底側悪性細胞	少数	多数
	核縁	-	肥厚
	クロマチンパターン	粗顆粒状	細顆粒状
	核小体	-	明瞭

### (1) 高異型度尿路上皮癌, G3(写真3)

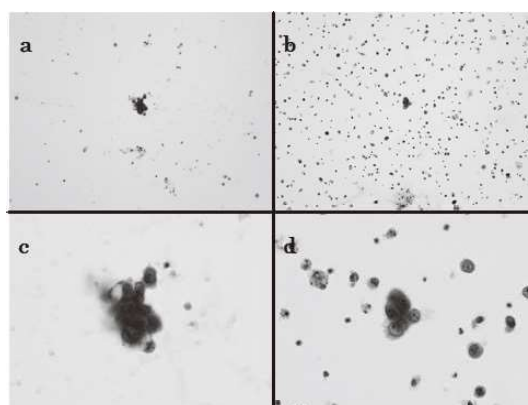


写真3: 尿路上皮癌, G3(自然尿)

a:従来法 対物10倍、b:LBC法 対物10倍  
c:従来法 対物40倍、d:LBC法 対物40倍

従来法では核縁の肥厚,粗大顆粒状のクロマチンパターンを観察することが可能であった。LBC法では散在性~集塊状に多数の異型のある上皮細胞が1視野内に多数認められるため、短い鏡検時間で悪性と判断できる可能性が示唆された。集塊の場合は重積性が増し、個々の核が濃染傾向にあるため詳細な核所見は読みにくくなるが、集塊の辺縁や散在性の悪性細胞を観察した場合、核縁の肥厚や核クロマチンが微細顆粒状となり1~複数個の赤染する核小体を同定しやすかった。

### (2) 膀胱小細胞癌(写真4)

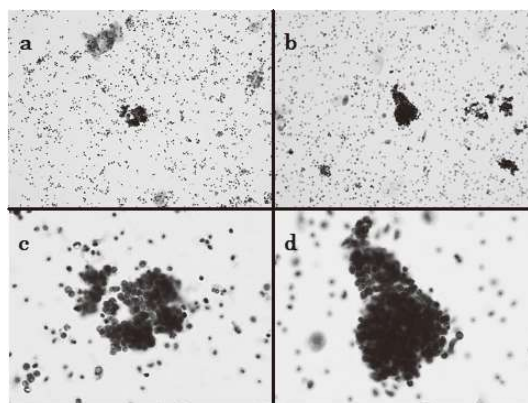


写真4: 小細胞癌(自然尿)

a:従来法 対物10倍、b:LBC法 対物10倍  
c:従来法 対物40倍、d:LBC法 対物40倍

従来法では小型でN/C比が高く、粗顆粒状のクロマチンパターンを呈する細胞が、孤立散在性～集塊状に見られた。LBC法では従来法に比べ、細胞集塊が多数認められ重積性が増していた。個々の細胞の大きさは従来法とLBC法で差はほぼなく、クロマチンにも明らかな差は見られなかったが、LBC法の方が比較的核小体が同定しやすかった。

(3) 前立腺癌, 膀胱浸潤(写真5)

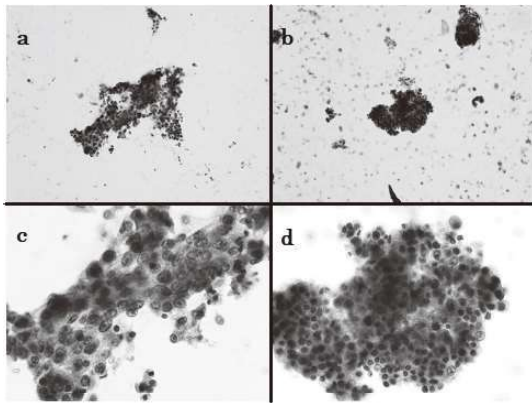


写真5: 腺癌, 前立腺癌膀胱浸潤(膀胱洗浄尿)  
a:従来法 対物10倍, b:LBC法 対物10倍  
c:従来法 対物40倍, d:LBC法 対物40倍

従来法ではシート状の細胞集塊が出現し、個々の細胞は泡沫状細胞質と明瞭な核小体を持ち、核縁の肥厚、細顆粒状のクロマチンを呈していた。LBC法では細胞集塊は多く塗抹されているが、個々の細胞集塊の辺縁が丸まり、集塊の大きさ自体は小型化していた。また核・細胞質共に縮小し、核は濃染しておりクロマチンパターンがはっきりしない細胞も見られたが、従来法と同様の細顆粒状を示していた。一方、核小体はより赤く鮮明に見ることができ、細胞集塊では核の偏在や突出の観察が可能であった。

(4) 子宮頸部扁平上皮癌, 膀胱浸潤(写真6)

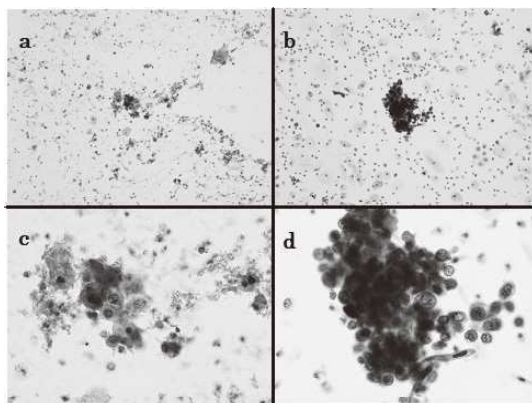


写真6: 扁平上皮癌, 子宮頸癌膀胱浸潤(自然尿)  
a:従来法 対物10倍, b:LBC法 対物10倍  
c:従来法 対物40倍, d:LBC法 対物40倍

従来法では背景の細菌が多く見られ、その中に細胞質がオレンジG好性の角化した腫瘍細胞や、細胞質が層状構造を呈する基底側の細胞が極少量見られた。LBC法では従来法よりも上皮細胞がより多く塗抹され、背景の細菌塗抹量は減少傾向にあった。またオタマジャクシ状の角

化した表層主体の腫瘍細胞も見られたが、よりN/C比が高く、核クロマチン増量が著しい基底側の細胞塗抹量は増加していた。従来法とLBC法では角化細胞にクロマチンパターンや細胞質の輝度に違いは見られなかったが、基底側の細胞は従来法では粗顆粒状を呈していたのに対し、LBC法では核小体が明瞭化し、細顆粒状のクロマチンとなり核縁の肥厚も見られた。

III. 考 察

1. 細胞塗抹量について

尿細胞診標本上に診断に必要な細胞量が塗抹されにくい要因として、①尿中に剥離する細胞量自体が少ない(膀胱洗浄尿などは除く)こと、②尿中に含まれる蛋白濃度が、尿細胞診に適する随時尿の場合10mg/dL以下と極めて低い(血清総蛋白量 6.6～8.1g/dL)ため、スライドガラスへの付着率が極めて低いこと<sup>7)</sup>、③付着率が極めて低いために、固定～染色～透徹までの過程で剥離してしまう可能性があること、④診断に必要な異型細胞や悪性細胞は正常細胞に比べ比較的大型であることが多く、標本を固定液に入れた時に生じる固定液とスライドガラス上の細胞との抵抗が大きいため剥離しやすいこと<sup>8)</sup>などが考えられている。

今回、従来法とLBC法を比較してみると、まず初見で受ける印象が大きく異なっていた。従来法よりもLBC法の方が細胞塗抹量が多く、上皮細胞集塊も多く見られた。また従来法に比べLBC法の方が、細胞重積が起りにくいことが示唆された。炎症細胞が多い検体において上皮細胞が選択的に塗抹されている点は、標本作製過程に細胞を自然沈降させる工程で、陰性荷電した上皮細胞の陽性荷電されている専用スライドガラスへの吸着が起こるというBDサイトリッチ<sup>TM</sup>法の原理によるものと考えられ、塗抹面単位面積当たりの有核細胞数が多く、細胞密度が上昇するという金城らの報告<sup>9)</sup>を裏付けるものと考えられる。ただし症例によっては、背景成分がほとんど塗抹されない場合もあった。細胞診は背景所見も重要であるため、上皮細胞の形態のみから標本を診断しなければならないというデメリットにもつながり、注意を要すると思われる。

一方、ごく稀ではあるが経験上、LBC法よりも従来法(主に引きガラス法やすり合わせ法)で作成された標本に、超大型細胞集塊が見られる事がある。LBC法では大型細胞集塊は多数見られるものの超大型細胞集塊が見られる事は少なく、LBC法では従来法に比べ細胞集塊が小さくなる傾向が見られた。LBC法の細胞集塊の大きさが小さくなった理由として、標本作製過程での検体混和操作により超大型細胞集塊がくずれ、小さな細胞集塊が形成されてしまう可能性や、サイトリッチ<sup>TM</sup>レッド保存液(以下、保存液)がアルコールベースであるため、細胞の小型化や集塊自体の凝集化により相対的に小さく見えるためと考えられた。

血性検体においては、背景の赤血球の多くが減少し、従来法では赤血球中に埋もれていた上皮細胞の観察がLBC

法では容易となった。この理由として保存液の有する溶血作用があり、保存液1mlで全血25～50 $\mu$ Lの溶血が可能である<sup>10)</sup>。血液含有量が多い検体は多量の赤血球に埋もれ本来目的とする細胞の鏡検が困難な場合があるが、この溶血作用により余分な赤血球の除去が可能である。ただしこの溶血作用の過信は禁物で、上記以上の赤血球が含まれた場合、検体のゲル化が起きることがある。ゲル化が起こった検体で標本作製を行った場合、上皮細胞は積載されず赤血球の塊のみが塗抹されていることが多い。あまりにも出血が強い場合には検体にそのまま保存液を加えるのではなく、遠心した上清を別のスピッツ等に取りよく混和した後、保存液中に1滴ずつ検体を滴下していくことなどで、検体のゲル化を防ぐことが可能である。

当院でLBC法導入前後の2014年と2017年の結果を比較したところ、尿細胞診報告様式で異型細胞以上に相当する報告が8%から15%と約2倍となっていた。この理由として、LBC法により細胞がスライドガラスに付着し剥離が軽減された結果、異型細胞の検出率が上昇したと考えられた。また2017年の陰性症例を除く132症例の細胞像を見直したところ、LBC法は従来法に比較し、診断する上で同等ないしは優れていることが明らかとなった(図2)。

## 2. 組織型別の細胞像について

おおまかな傾向として、LBC法により①細胞核が濃染傾向を示すこと、②細胞集塊の重積性が増し、個々の核の観察が困難となること、③核小体が明瞭化することの3点が多くの組織型に共通する事項と考えられた。①②の理由として白波瀬らは、BDシユアパス™液状処理細胞診システムは沈降法を原理としているため、液体中に浮遊する細胞がそのままスライドガラスに電荷吸着されるため、細胞集塊は直接塗抹法よりもさらに立体的に塗抹され、球状が保たれたままの核はヘマトキシリン染色性が濃く見える傾向にある<sup>11)</sup>と述べている。また③の理由としては、クロマチンが粗大顆粒状から微細顆粒状へと弱い凝集に変化するため、核小体がより見えやすくなったものと考えられる。

細胞の大きさはやや収縮ぎみになり細胞質の厚みが増すものの、核の大きさは著しく異なることはなかった。これは腫瘍細胞が尿中に浮遊している際の浸透圧の影響の寄与が大きいと推測され、その後添加される保存液の影響は少ないと考えられた。

尿検体のLBC標本の細胞所見として平らは、①集塊は3次元的になるが、他の細胞が重なることはほとんどない。②細胞がやや収縮ぎみとなり、胞体のライトグリーン好性が強くなる。③核は濃染ぎみとなるが、クロマチンの凝集は弱くなる傾向がある。核縁は目立たなくなることがあるが、核小体は赤く目立つようになる。と述べている<sup>12)</sup>。また金城らは、細胞採取後より新鮮な状態で細胞の固定を行うLBCは、尿中に剥離した細胞を、剥離後すぐに固定を行うため変性が少ない細胞を保存できることが利点であるが、粗大顆粒状のクロマチンパターンが少なく、クロマチンが微細化される傾向にあり、これがLBC標本におけるピットフォールの1つといえる。と述べている<sup>9)</sup>。

当院の症例でも、従来法に比べLBC法では微細顆粒状のクロマチンパターンへ変化すること、核小体が明瞭化することが確認できた。このため核所見が大きく変化することの理解と、習熟するための鏡検トレーニングが必要であると考えられた。

その他の組織型では症例数が少ない事もあるが、扁平上皮癌の基底側細胞を除き、従来法とLBC法で核小体が明瞭となる以外には大きな核所見の差は見られなかった。

## IV. 結 語

尿細胞診標本作製法として、従来法では標本作製過程で細胞剥離しやすいという問題があるが、LBC法では細胞塗抹量が上昇し、診断に有意義な細胞が標本に塗抹されるため、診断率の向上が期待できる。引き続き症例を蓄積し、さらにLBC法のメリット、デメリットの解析を行いたい。

本研究は、2019年第22回日赤検査学術大会にて発表した。

申告すべきCOI状態はない。

## 文 献

- 1)細胞検査士会(編):細胞診標本作製マニュアル, 2005.
- 2)吉本真:技術講座 液状検体の取扱い方-細胞診を中心に2 尿, Medical Technology, vol.22,no.2,103-108,1994.
- 3)夏目園子 他:技術講座 尿細胞診のフィルター法, 検査と技術, vol.36,no.2,105-108,2008.
- 4)大崎博之:V 細胞診 総論2標本作製法 2集細胞法, 検査と技術, vol.37, no.10,1144-1146,2009.
- 5)曲師妃春 他:当院における液状化検体細胞診法の導入効果, 旭川赤十字病院医学雑誌, vol.31, 12-16, 2019.
- 6)畠山重春:技術講座 液状検体の取扱い方-細胞診を中心に1 髄液, Medical Technology, vol.22,no.1,29-35,1994.
- 7)西国広(編):~基礎から学ぶ~細胞診のすすめ方, 10-11, 近代出版,大阪,2012.
- 8)土田秀 他:液状化細胞診を用いた尿細胞診の検体処理法の検討, 日本臨床細胞学会雑誌, 第52巻第5号, 406-410,2013.
- 9)金城満 他:尿のLBC, 臨床検査, vol.58, no.6, 693-701, 2014.
- 10)BDサイトリッチTM標本作製手順/非婦人科材料用手法, 日本BD, 2020.1.27, <https://www.bdj.co.jp/cytology/support/hkdqj2000008d9jg.html>
- 11)白波瀬浩幸:細胞診の精度向上を目指して-直接塗抹法・LBC法の基本と要点を整理する-症例から学ぶ 細胞診のポイント 呼吸器, Medical Technology, vol.42,no.7,680-685,2014.
- 12)平紀代美 他:病理 liquid-based cytologyの非婦人科検体への応用(尿・体腔液), 検査と技術, vol.40, no.2,121-126,2012.