

[臨床研究]

細胞診断における簡易セルブロックの有用性

¹尾道市立市民病院 中央検査室, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科,
³尾道市立市民病院 内科

戸田 久美子¹, 竹井 絵梨¹, 木下 実穂¹, 森田 美智子¹, 松川 昭博²,
開原 正展³

要 旨 2016年12月より細胞診標本作製後の残検体を用いた遺伝子変異解析や発現タンパクの検出を目的とした簡易セルブロックの作製を開始した。同時に、細胞診とセルブロックとの併用による診断精度の向上にも取り組んだ。今回、2021年3月までにセルブロックを作製した68例について有用性を検討した。

その結果、細胞診残検体によるセルブロックを用いて免疫染色を追加でき、良悪性の鑑別に加えて組織型の決定も可能となった症例があった。さらに組織検体を採取できない症例でもコンパニオン診断を実施できるようになり、セルブロックの有用性が認められた。

Key words: セルブロック, 細胞診, コンパニオン診断

はじめに

セルブロックは、細胞診検体の沈渣をホルマリン固定後、パラフィン包埋して作製した標本である。HE染色での細胞所見の観察が可能であり、特殊染色や免疫染色の追加も簡便にできる^{1) 2)}。また、細胞検体では実施困難な遺伝子解析検査や発現タンパクの検出も可能となる³⁾。これにより、ゲフィチニブやオシメルチニブにおけるEGFR遺伝子変異やトラスツマブにおけるHER2タンパクなど、治療薬が標的とする遺伝子変異やタンパクの発現等を検査するコンパニオン診断を行うことで、治療薬の有効性や安全性を考慮した治療選択を行うことができる⁴⁾。当検査室では、2015年より細胞診残検体にてEGFR遺伝子変異検査を実施するため細胞沈渣を凍結保存していたが、2016年12月より、組

織採取が困難である症例のより広域なコンパニオン診断を目的に、安価で操作が簡便な方法¹⁾を用いてセルブロック作製を開始した。現在では病理検査技師の技能向上により、セルブロックを安定的に作製できるようになった。今回、2016年12月から2021年3月までの期間で作成したセルブロック68例について有用性を検討したので報告する。

対象と方法

2016年12月から2021年3月までの期間で、細胞診標本作製後に充分量残った検体や当初からセルブロック作製が目的で提出された検体を対象とした。症例数は全例68例、うち胸水38例、腹水11例、EUS-FNA4例、気管支洗浄液6例、甲状腺穿刺4例、耳下腺穿刺、皮下血腫穿刺、リンパ節穿刺、

Utility of simple cell block in cytology diagnosis

¹Department of Clinical Laboratory, Onomichi Municipal Hospital

²Department of Pathology and Experimental Medicine, Okayama University

³Department of Internal Medicine, Onomichi Municipal Hospital

Kumiko Toda¹, Eri Takei¹, Miho Kinoshita¹, Michiko Morita¹, Akihiro Matsukawa²,
Masanobu Kaihara³

肝腫瘍穿刺，自然尿それぞれ1例であった。いずれの検体も受付直後に3,000rpm 5分間の遠心を行い，上清を取り除き，細胞診標本を作製したのち，沈渣を1.5mL マイクロチューブ（アジア器材株式会社，ポリエチレン製サンプリングチューブ1.5mL）に入れ，同じ条件で再遠心した。再度上清を取り除いた後，沈渣を巻き上げないように10%中性緩衝ホルマリンをゆっくりと注入し，一晚室温固定した。ホルマリン固定後，沈渣が入っているマイクロチューブの先端部分を切り離し，半分に割を入れ，スポンジで挟んだ状態でカセットに入れたものをパラフィン浸透装置にかけた。パラフィン浸透終了後，マイクロチューブの先端部分から固化した沈渣を取り出し，パラフィン包埋を行った（図1）。その後通常の薄切にてHE染色を行った。

結果

全例68例でセルブロックを作製できた。その内組織検体採取があったのは25例（36.8%）であった。セルブロックでの病理組織検査依頼があったのは15例（22.1%）であった。内訳は胸水12例，腹水2例，気管支洗浄液1例であり体腔液が主であった。セルブロック診断は，陽性7例（胸水6例，腹水1例），疑陽性1例（気管支洗浄液），陰性7例（胸水6例，腹水1例）であり，それに対して細胞診では陽性5例（胸水4例，腹水1例），疑陽性1例（気管支洗浄液），陰性9例（胸水8例，腹水1例）であった。胸水2例において細胞診陰性であったが，セルブロックにより陽性と診断された症例がみられた。

また，セルブロック全例の内4例（5.9%：胸水3

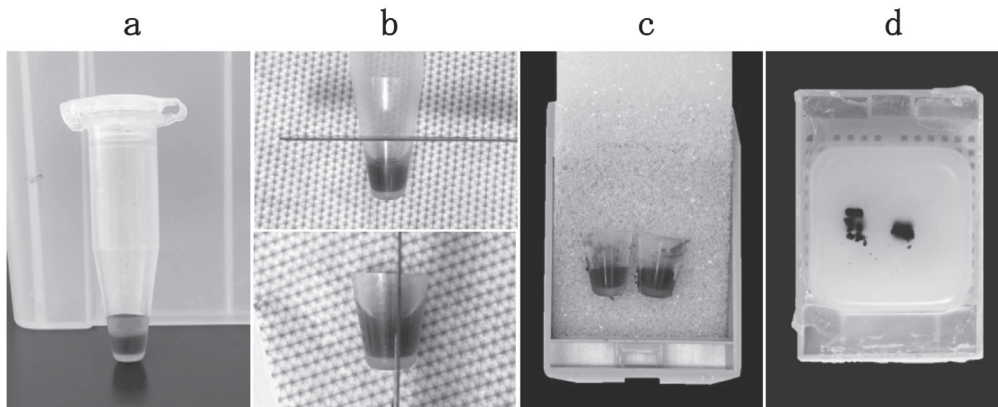


図1 セルブロック作製過程例

- a：遠心分離後10%中性緩衝ホルマリンにて室温固定
- b：マイクロチューブの先端を切り取り半割
- c：固化した沈渣をカセットに入れる
- d：完成したパラフィンブロック

例、腹水 1 例) に対して細胞診検体しか採取できなかった症例でもコンパニオン診断を行うことができ、8 例 (11.8% : 胸水 7 例, 腹水 1 例) に対して免疫染色, 2 例 (2.9% : 胸水 2 例) に対して特殊染色 (PAS 染色) を施行することができた。

症例紹介

セルブロックにて診断を行った症例のうち、有用であったと考えられる症例を 2 例紹介する。

1 : 症例 1 (70 歳代 男性 胸水)

左胸部痛を主訴として、近医にて X 線単純撮影, CT を施行。左胸水と右肺野多発結節を認めため、当院にて良悪性診断の目的で胸水穿刺が行われた。病理検査部門で、細胞診の実施および残検体を用い

てセルブロックを作製した。細胞診標本では一部に核腫大した細胞が少数認められるのみで、明らかな悪性細胞は認められないため、陰性の判定となった (図 2-a)。セルブロック標本を確認したところ、悪性を疑う異型細胞が認められたため、臨床医に報告し、セルブロックにて病理診断を行うこととなった。セルブロック標本では、リンパ球を背景に、大型な核を有する異型細胞が孤在性あるいは小集塊状に多数出現しており、核の偏在傾向を認め、核小体が目立つことから腺癌が推定された (図 2-b)。腺癌の確定のため、PAS 染色と各種免疫染色を行い、腫瘍細胞中に PAS 染色陽性の粘液を認め (図 2-c)、AE1/3 陽性、肺腺癌に特異性の高い TTF1 陽性 (図 2-d)、扁平上皮癌で陽性を示す p63 陰性となったため、肺原発腺癌と診断できた⁵⁾。さらにセルブロッ

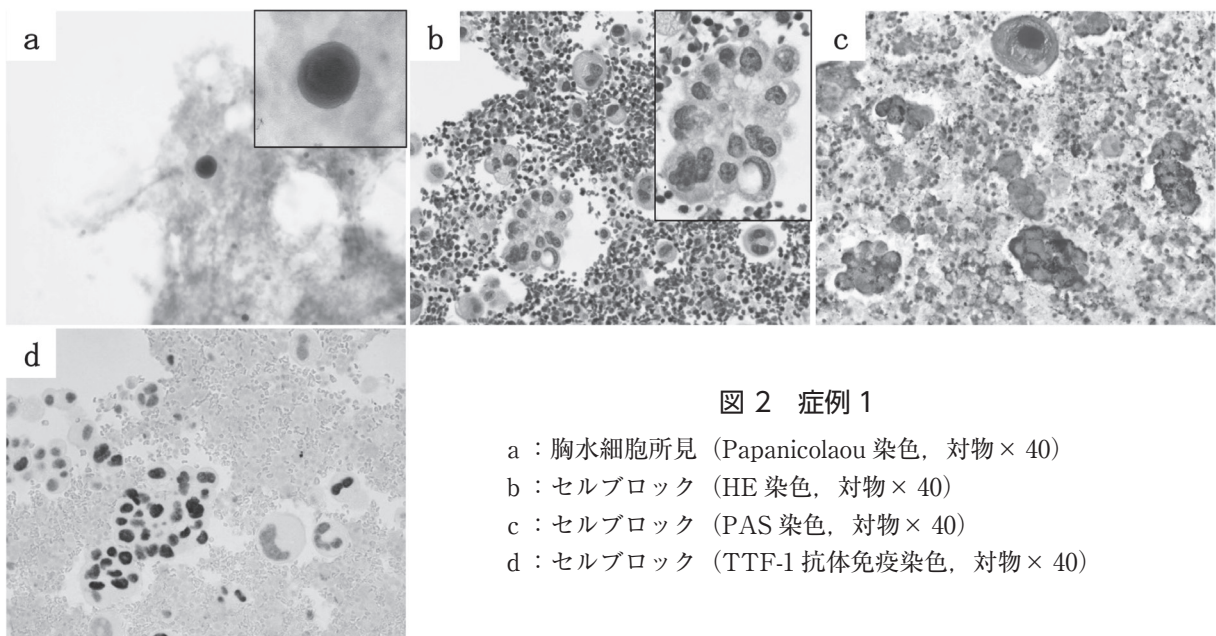


図 2 症例 1

- a : 胸水細胞所見 (Papanicolaou 染色, 対物×40)
- b : セルブロック (HE 染色, 対物×40)
- c : セルブロック (PAS 染色, 対物×40)
- d : セルブロック (TTF-1 抗体免疫染色, 対物×40)

ク標本から EGFR 遺伝子変異 v2.0 (リアルタイム PCR 法), ALK タンパク D5F3 (IHC 法), PD-L1 タンパク 22C3 (IHC 法) の検索を行い, EGFR 変異陽性 (exon21 L858R), PD-L1 タンパク 22C3 発現率 15%, ALK タンパク陰性の結果を得たため, オシメルチニブでの治療が開始された。

2: 症例 2 (70 歳代 男性 気管支洗浄液)

膀胱癌術後, 早期胃癌 ESD 術後 4 年経過した症例。紹介医により右股関節の病的骨折を認め, CT にて右股関節の他に骨盤に多発性の骨溶解像が認められた。また, 左肺に肺癌を疑う腫瘤像が認められたことから, 肺原発か転移性かの鑑別目的にて透視下気管支鏡検査 (bronchofiberscope, BF) が行われた。1 回目の肺生検組織では異型が認められなかったが, 同時に採取された気管支洗浄液にて細胞診とセルブロック作製を行ったところ, 細胞診標本では, やや異型のみられる上皮集塊が一部認められ, atypical cell と判定された (図 3-a)。セルブロック標本においては N/C 比の増加など, 細胞診標本と比較してより強い異型を示す上皮がわずかに認められ, atypical cell と判定された (図 3-b)。その後, 確定診断のために行われた 2 回目の BF では提出検体中に悪性所見は認められなかったが, 3 回目の BF にて, 核腫大を示す異型細胞の集塊が認められ (図 3-c), 組織型同定のために既往の膀胱癌 (図 3-d), 胃癌組織 (図 3-e) と併せて免疫染色が

行われた。その結果, 肺組織にて CK7 陽性, CK20 陽性, CDX2 陰性, TTF-1 陰性, 膀胱癌組織にて CK7 陽性, CK20 陽性, CDX2 陰性, TTF-1 陰性, 胃癌組織にて CK7 陽性, CK20 陰性, CDX2 陽性, TTF-1 陰性となり, 膀胱癌の転移と診断された。(図 3-f ~ h, 表 1)

考 察

症例 1 では, 細胞診の残検体でセルブロック標本を作製することにより, 悪性細胞の見落としを防ぐことができた。また, 細胞検体しか採取できない症例でも特殊染色や免疫染色を施行することで組織型や原発巣が同定でき, コンパニオン診断も可能であった。また症例 2 では採取した組織に異型細胞が認められない場合でも気管支洗浄液の細胞診にて異型細胞が認められ, セルブロック標本でより異型の強い細胞を得たことで細胞診の所見を裏付け, 確定診断のために複数回の組織採取を行う根拠となり得たと考えられる。細胞診は, 個々の細胞異型をとらえることに適している反面, 細胞重積がみられた場合は構造異型の判断が困難なことがある⁶⁾。また細胞診検体を用いて特殊染色や免疫染色を行う際には細胞転写法を用いる等, 手間がかかるという面もある²⁾。セルブロックの利点は, 細胞異型所見に加えて構造異型が明確にとらえることができ⁶⁾, 通常ホルマリン固定組織と同様の方法で特殊染色や免疫染色が追加できることである²⁾。そのため,

表 1 CK7 と CK20 の染色性による癌の鑑別診断⁵⁾

	CK7 陽性	CK7 陰性
CK20 陽性	尿路上皮癌, 粘液性卵巣癌, 膵臓癌, 胆道癌, 胃癌	結腸・直腸癌, 胃癌, Merkel 細胞癌
CK20 陰性	肺腺癌, 乳癌, 子宮内膜癌, 漿液性・類内膜性卵巣癌, 胃癌, 膵臓癌, 悪性中皮腫, 低分化神経内分泌癌, 甲状腺癌, 唾液腺癌, 腎細胞癌	肝細胞癌, 前立腺癌, 胃癌, 扁平上皮癌, 神経内分泌癌, 副腎皮質癌, 悪性中皮腫

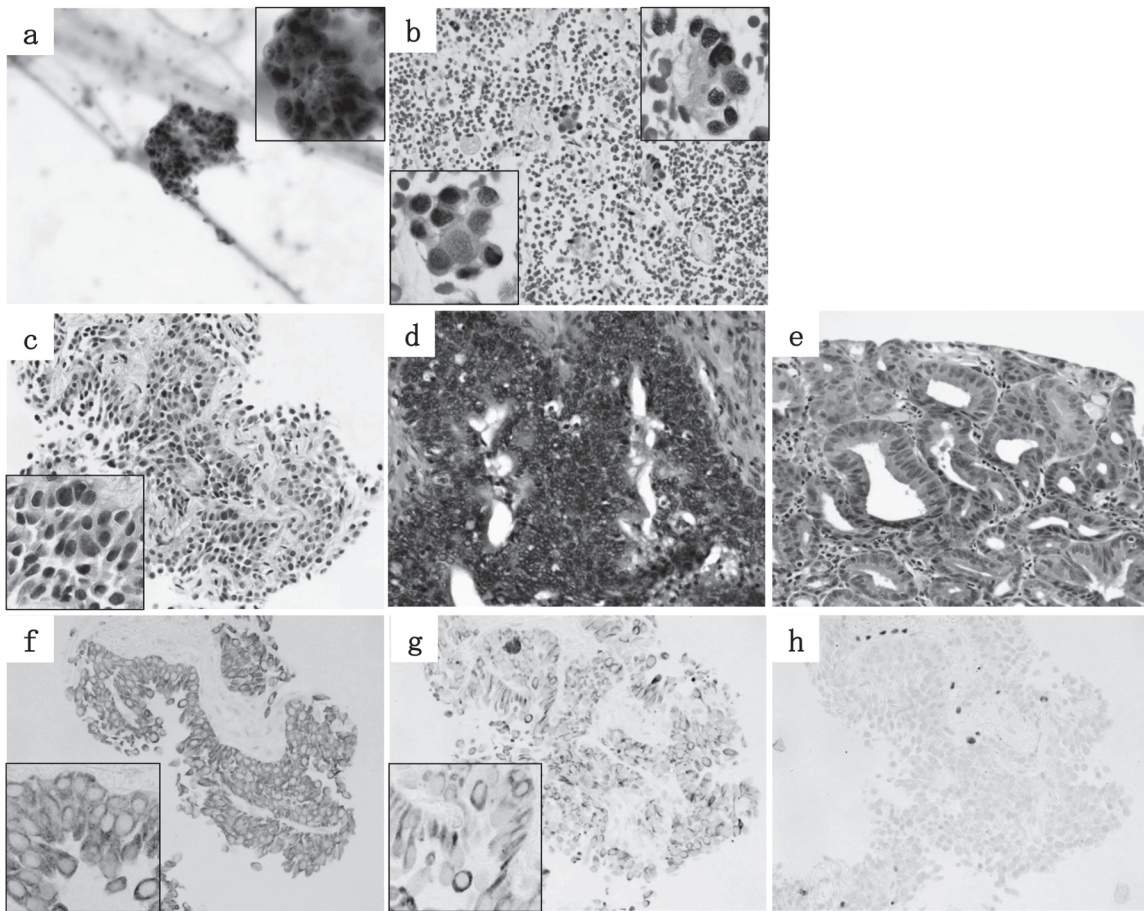


図 3 症例 2

- a : BF (1回目) 気管支洗浄液細胞所見 (Papanicolaou 染色, 対物×40)
 b : BF (1回目) 気管支洗浄液セルブロック (HE 染色, 対物×40)
 c : BF (3回目) 肺生検 (HE 染色, 対物×40)
 d : 膀胱がん (HE 染色, 対物×40)
 e : 胃癌 (HE 染色, 対物×40)
 f : BF (3回目) 肺生検 (CK7 抗体免疫染色, 対物×40)
 g : 同 上 (CK20 抗体免疫染色, 対物×40)
 h : 同 上 (TTF-1 抗体免疫染色, 対物×40)

セルブロックを併用することで弱点を補うことができ、今回の症例のように細胞診での見落とし等を防ぐことができると考えられる。ただし、セルブロック作製には充分量の細胞沈渣が必要であり、微量検体には使用できない点に注意しなければならない²⁾。

当院が採用したセルブロック作製法は、様々なセルブロック作製法 (コロジオンバッグ法, クライオバイアル法⁷⁾, アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法⁸⁾ 等) がある中で、専用の試薬や器具の

準備が不用であり、さらに作業手順も簡潔であるため、安価で簡便に行うことができる¹⁾。また、パラフィンブロックに包埋しているため細胞検体では難しい半永久的な保存も可能である。細胞診検体とともに簡易セルブロックを作製することは、低コストで実施可能であり、より詳しい検査の追加が可能であるため、正確な病理診断、治療方針の決定において大変有用と考えられる。

しかし、今回検討した期間中に作製されたセルブ

ロック標本で組織診まで至ったものは全体の22.1%に止まった。これは組織採取も並行して行われ、組織診断によって十分な診断がなされている症例、セルブロック標本にも悪性所見を持つ細胞が確認できず細胞診のみで判定が行われた症例などがあったことによると考えられる。

今回、セルブロックで診断が施行されていたものは体腔液が主であった。体腔液への播種の有無は予後因子の一つであり、治療方針の決定に大きく関わってくるため³⁾、細胞診断が唯一の診断材料となった場合、重要度がかなり高いと思われる。また、細胞診とセルブロックの併用の大きな利点として、検体採取の侵襲の低さがあるため、生検を行う前に診断の確定ができれば、診断の低侵襲化が実現でき、精度を高めるとともに治療成績の向上に寄与できると考えられる。

まとめ

セルブロック標本を作製することで、細胞診検体への特殊染色や免疫染色、コンパニオン診断が可能となり、組織型・原発巣の決定や治療方針の決定の一助となると考えられた。しかし、当院においてセルブロックに対して病理診断が行われている症例は全例に対してまだ少なく、症例増加のために今回認めたセルブロックの有用性などを臨床に周知する検討を行う必要性を感じた。今後、組織診の代わりに穿刺吸引細胞診が行われる甲状腺穿刺検体のように、細胞診検体による診断に特に高い正診率が求められる分野⁹⁾においてもセルブロック標本による診断向上を進めていきたい。

文 献

- 1) 信広 亮輔, 柴田 淳, 小林 剛, 他: 消化器および体腔液細胞診における簡易セルブロック作製法併用の有用性. 医学検査 64巻2号: 196-201, 2015.
- 2) 西村 理恵子, 寺本 典弘, 山本 珠美, 他: 穿刺吸引検体におけるセルブロックの有用性. 日本臨床細胞学会雑誌 51巻4号: 235-240, 2012.

- 3) 真下 照子, 井上 慶一, 北野 宏, 他: 細胞診断におけるセルブロックの活用. 京都第二赤十字病院医学雑誌 35巻: 72-77, 2014.
- 4) 登 勉: コンパニオン診断: 個別化医療における意義と将来展望. 痛風と核酸代謝 36巻2号: 79-85, 2012.
- 5) 森永 正二郎: 1. 原発不明癌の病理診断における免疫染色の意義. 「病理と臨床」常任編集委員会, 病理と臨床臨時増刊号 - 免疫組織化学診断と治療選択の指針 - (32巻). 文光堂, 東京都文京区本郷7-2-7. 64-75, 2014.
- 6) 細胞検査士会 (編): 細胞診標本作製マニュアル(体腔液) 1版. 細胞検査士会, 東京都. 16-18, 2008.
- 7) 佐野 順司, 吉本 尚子, 溝口 良淳, 他: アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法の有用性についての検討. 日本臨床細胞学会雑誌 44巻5号: 291-297, 2005.
- 8) 菅間 博, 亀山 香織: 「特集2. 甲状腺の細胞診の新しい報告様式と技術」によせて. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 31巻2号: 98, 2014.
- 9) 藪下 廣光, 古谷 博, 水野 義己, 他: 子宮体癌のスクリーニングにおける子宮内膜細胞診とセルブロック法併用の有用性. 日本臨床細胞学会雑誌 34巻6号: 1089-1093, 1995.