

子宮内膜細胞診における ThinPrep®LBC での CytoLyt® 液による溶血処理の有用性 —直接塗抹法との比較—

則松良明*, 佐藤正和**, 香川昭博***, 寺本典弘****

Efficacy of CytoLyt® hemolytic effect on ThinPrep® LBCs for endometrial cytology —Comparison with direct smears—

Yoshiaki NORIMATSU*, Masakazu SATHO**,
Akihiro KAGAWA***, Norihiro TERAMOTO****

Abstract

The primary complaint in endometrial cytology is abnormal bleeding; thus, adequate hemolysis of red blood cells and a sufficient amount of cell smear when performing the ThinPrep (TP) method, a liquid-based cytology preparation, must be ensured. We evaluated the use of CytoLyt solution (CyL: 25% methanol buffer) in hemolysis method for the TP method. TP specimens were prepared after hemolyzing endometrial specimens for 1h and compared with direct smears. TP specimens were significantly smaller than direct smears in terms of the diameter of the cell cluster. However, no significant differences were observed between direct smear specimens in terms of cell cluster number and nuclear overlapping. Furthermore, regarding diagnostic accuracy, neither of the two cytotechnologists found a significant difference between direct smears and TP specimens. These findings indicate that TP specimens have the same quality as direct smears and that the same evaluation methods as those used for direct specimen smearing can be applied. This study confirmed that 1-h hemolysis induction using CyL is useful in preparing TP specimens for endometrial cytology.

Keywords: 子宮内膜細胞診, ThinPrep®法, CytoLyt®液, 溶血処理法

序 文

子宮頸部細胞診において、直接塗抹法は、塗抹後の採取器具への細胞残存によるサンプリングエラー¹⁾のみならず、血液、粘液、炎症細胞等の目的細胞への被覆によるスクリーニングエラーをも発生し、問題となっていた²⁾。一方、液状化検体細胞診(liquid-based cytology: LBC)法は採取した細胞を細胞保存液中に浮遊させ、固定後、細胞を均一化した状態からスライドガラスに薄層塗抹する方法であるため、細胞の回収率を高め、乾燥を防ぎ、さらに限定された範囲内に均等な細胞密度でかつ細胞同士の重なりが少ない塗抹が可能である。そのため、直接塗抹標本で問題となっているサンプリングエラーやスクリーニングエラーを防ぐことが期待されている³⁾。

世界的に代表的なものとして、米国食品医薬品局で認可されたThinPrep® (TP)法(Hologic, Marlborough, MA)とBD SurePath™(SP)法(BD Diagnostics, Franklin, NJ)の2方法がある。しかしながら、それらLBC法は標本作製原理や使用する試薬などが異なるため、作製される標本において細胞の塗抹量や形態に差異が生じ、評価も異なることが報告されている⁴⁻⁶⁾。

われわれは不正出血を主訴とすることが多い子宮内膜細胞診においてTP法を日常業務で実施する場合、赤血球の除去や細胞塗抹量の早急な改善は必須であると考え、TP法における溶血処理法としてHologic社から推奨されているCytoLyt®液(CyL:25%メタノール緩衝液)に注目し、その運用方法を検討した。その結果、CyLでの処理(混和後静置)を1時間行うことが、溶血処理がムラなく作用し、多数の塗抹

*愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科 **倉敷芸術科学大学生命科学部生命医科学科
独立行政法人国立病院機構高知病院臨床検査科 *独立行政法人国立病院機構四国がんセンター病理科

細胞が得られることが明らかになった⁷⁾。

しかしながら、上述の検討は培養細胞での検討であるため、日常業務での子宮内膜細胞診検体を使用した検証とともに直接塗抹標本との比較が必要である。今回われわれは、不正出血を伴う患者の検体を用いた子宮内膜細胞診標本作製時において、CyLでの溶血処理を試み、その運用が有用かどうか検討したので報告する。

方 法

1.対象

2012年6月から2013年12月の期間の四国がんセンターにおいて、性器出血、また画像等で子宮内膜に異常肥厚像等があり、子宮内膜検査（細胞診および組織診を同日に採取）を必要とした患者のうち同意が得られた患者とした。症例について検討項目1から3では、子宮内膜組織生検において診断された非腫瘍性病変例15例（分泌期内膜;2例、子宮内膜腺間質破綻;1例、悪性所見なし;12例）、腫瘍性病変例13例（子宮内膜異型増殖症;2例、類内膜癌Grade1;7例、Grade2;3例、漿液性癌;1例）を対象とした。検討項目4については新たに非腫瘍性病変例23例（分泌期内膜;1例、子宮内膜腺間質破綻;1例、悪性所見なし;21例）、腫瘍性病変例15例（子宮内膜異型増殖症;2例、類内膜癌Grade1;9例、Grade2;3例、Grade3;1例）を対象とした。

内膜細胞診材料は、子宮内膜ブラシ（オネストスーパーブラシTM、オネストメディカル社、東京）を使用して、子宮内膜腔から採取し、直ちにブラシヘッドをスライドガラスに押し当て、細胞を塗抹し、直接塗抹細胞標本を得た。次にTP標本を得るため、採取器具のブラシヘッドをCyL容器内に浸漬・洗浄し、ブラシヘッドに残った子宮内膜細胞を回収した。

なお、本研究は四国がんセンター研究倫理委員会の承認を得ている（承認番号H24-No.7;承認日2012年4月23日）。

2. TP法による標本作製⁷⁾

1)採取器具であるブラシヘッドをCyL容器の底に採取器具を10回程度押し付け、さらに強くかき回す。
2)CyL容器を、数回転倒混和し、1時間、静置する。
3)時間経過後、容器を1200G、5分間遠心する。
4)遠心後、上清をデカントし、得られた細胞沈渣を細胞保存液であるPreservCyt[®]液(55%メタノール緩衝液)が入った容器内に回収し、数回転倒混和後、30分以上固定する。
5)固定終了後、ThinPrep 5000オートメーションスライド・プロセッサ[®]において標本作製する。その工程を要約すると、バイアルが回転して細胞を分散した後、陰圧によって細胞を均等にフィルター膜に収集し、次にフィルター上の細胞を陽圧によりスライドガラス上に転写（塗抹）して標本作製した。

なお、スライドガラスについて、ThinPrep[®] Microscope Slides(TP-slide)は非コーティングであり、細胞接着能力を見

るために、MASコートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社、大阪府:TP-coat slide)も使用した。

3. 検討項目

直接塗抹標本とCyL溶血処理1時間実施後のTP標本(TP-slide, TP-coat slide)において、下記の項目について比較した。

1)細胞集塊数

細胞集塊は50個以上の細胞から構成されるものと定義した。1症例ごとに任意に対物レンズ4倍視野での細胞集塊の数を10視野計数し、その中央値を算出した。

2)細胞集塊の長径

1症例ごとに任意に対物レンズ4倍視野での細胞集塊の長径について、ImageJソフトウェア version 1.51 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いて10視野測定し、その中央値を算出した。

3)核重積

1症例ごとに任意に対物レンズ40倍視野で10個の細胞集塊を選択し、それぞれの核重積度を計数し、その中央値を算出した。核重積とは少なくとも2層以上の核の重なりを細胞集塊中に認められることと定義し、顕微鏡において、焦点をずらしていくと、観察されている核が完全に消失し、別の核が現れることである。さらに、焦点をずらしていくと、また、別の核が現れる場合、核重積は3層である。

4)細胞診判定精度

検討項目1から3の結果から、TP法で使用する2種のスライドガラスでより適している方を選択し、同一検体での直接塗抹標本とCyL溶血処理1時間でのTP標本について、子宮内膜細胞診判定において10年以上の経験を持つ2名の細胞検査士が、盲目的にそれぞれに標本を鏡検し、判定した。細胞診の判定方法に関して、Yanohら^{8,9)}の記述式子宮内膜細胞診報告様式を使用し、「陰性、異型子宮内膜細胞、陽性」に分類した。異型子宮内膜細胞は「意義不明」および「子宮内膜異型増殖症などを除外できない」の2つのカテゴリーに細分類し、最終的に、異型子宮内膜細胞-意義不明は陰性に、異型子宮内膜細胞-子宮内膜異型増殖症などを除外できないは陽性とした。その後、組織診断との比較を行い、判定精度を検討した。本検討における、2名の細胞検査は、年齢を除く全ての臨床情報は知らされていない。

5)統計解析

統計解析による有意差検定は、SPSS Statistics 29.0 (日本アイ・ビー・エム株式会社、東京)を使用し、非腫瘍性病変と腫瘍性病変のそれぞれについて、直接塗抹標本、TP-slide(コーティングなし)、TP coat slide(コーティングあり)での多重比較をFriedman's testを、直接塗抹標本とTP標本での判定精度の比較については、Fisher's exact testを実施した。p値0.05未満について有意とみなした。

結 果

1)細胞集塊数(表1)

非腫瘍性病変において、直接塗抹標本(直接塗抹)での細胞数の中央値(四分位範囲)は2.0(1.4-4.5)個、TP標本でのTP-slideは2.2(1.7-3.2)個、TP-coat slideでは2.4(1.4-3.6)個であり、それぞれの間において、有意な差を認めなかった($p=0.878$)。腫瘍性病変では、直接塗抹は4.4(3.2-6.0)個、TP-slideは3.3(2.4-4.1)個、TP-coat slideでは3.1(2.4-5.9)個であり、それぞれの間において、有意な差を認めなかった($p=0.342$)。

2)細胞集塊の長径(表1)

非腫瘍性病変において、直接塗抹での細胞集塊の長径の中央値(四分位範囲)は305.5(230.6-468.3) μm 、TP-slideは178.4(149.5-202.2) μm 、TP-coat slideでは193.0(139.2-215.7) μm であり、直接塗抹はTP-slideおよびTP-coat slideと比較して、それぞれ有意に高値であった($p<0.001$)。腫瘍性病変では、直接塗抹は346.5(242.5-606.6) μm 、TP-slideは215.0(176.8-268.5) μm 、TP-coat slideでは222.9(159.1-320.8) μm であり、直接塗抹はTP-slideおよびTP-coat slideと比較して、それぞれ有意に高値であった($p=0.011$)。

3)核重積(表1)

非腫瘍性病変において、直接塗抹での核重積度の中央値(四分位範囲)は1.1(1.0-1.4)層、TP-slideは1.0(1.0-1.6)層、TP-coat slideでは1.0(1.0-1.7)層であり、それぞれの間において、有意な差を認めなかった($p=0.894$)。腫瘍性病変では、直接塗抹は1.9(1.5-2.0)層、TP-slideは1.6(1.4-1.8)層、TP-coat slideでは1.9(1.4-2.0)層であり、それぞれの間において、有意な差を認めなかった($p=0.584$)。

表1 標本作製法別による細胞の比較

非腫瘍性病変 (15例)	細胞集塊数 (個)	細胞長径 (μm)	重積度 (層)
直接塗抹	2.0 (1.4-4.5)	305.5 (230.6-468.3)	1.1 (1.0-1.4)
TP-slide	2.2 (1.7-3.2)	178.4 (149.5-202.2)	1.0 (1.0-1.6)
TP-coat slide	2.4 (1.4-3.6)	193.0 (139.2-215.7)	1.0 (1.0-1.7)
P 値	$p=0.878$	$p<0.001$	$p=0.894$

腫瘍性病変 (13例)	細胞集塊数 (個)	細胞長径 (μm)	重積度 (層)
直接塗抹	4.4 (3.2-6.0)	346.5 (242.5-606.6)	1.9 (1.5-2.0)
TP-slide	3.3 (2.4-4.1)	215.0 (176.8-268.5)	1.6 (1.4-1.8)
TP-coat slide	3.1 (2.4-5.9)	222.9 (159.1-320.8)	1.9 (1.4-2.0)
P 値	$p=0.342$	$p=0.011$	$p=0.584$

()内は四分位範囲

Friedman's test ($p<0.05$)

表1 非腫瘍性病変および腫瘍性病変ともに、TP-slide標本およびTP-coat slide標本は直接塗抹標本に比べ、細胞集塊長径が有意に小型を示したものの、細胞集塊数や核重積度は直接塗抹標本との間において、有意な差を認めなかった。

4)細胞診判定精度(表2)

検討項目1から3の結果から、TP-coat slide標本が選択された。細胞検査士Aでの直接塗抹標本およびTP-coat slide標本における感度は前者78.6%(11/14例)、後者76.9%(10/13例)、特異度は前者95.8%(23/24例)、後者92.0%(23/25例)、陽性的中率は前者91.7%(11/12例)、後者83.3%(10/12例)、陰性的中率は前者88.5%(23/26例)、後者88.5%(23/26例)であった。細胞検査士Bでの直接塗抹標本およびTP-coat slide標本における感度は前者100%(20/20例)、後者100%(13/13例)、特異度は前者94.4%(17/18例)、後者92.0%(23/25例)、陽性的中率は前者95.2%(20/21例)、後者86.7%(13/15例)、陰性的中率は前者100%(17/17例)、後者100%(23/23例)であった。細胞検査士2名それぞれでの判定精度(感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率)について、直接塗抹標本とTP-coat slide標本との間において、いずれも有意な差が認められなかった(p 値0.559~1.000)。

表2 細胞診判定精度

細胞検査士 A	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
直接塗抹標本	78.6 (11/14)	95.8 (23/24)	91.7 (11/12)	88.5 (23/26)
TP coat slide	76.9 (10/13)	92.0 (23/25)	83.3 (10/12)	88.5 (23/26)

細胞検査士 B	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
直接塗抹標本	100 (20/20)	94.4 (17/18)	95.2 (20/21)	100 (17/17)
TP coat slide	100 (13/13)	92.0 (23/25)	86.7 (13/15)	100 (23/23)

Fisher's exact test ($p<0.05$)

表2 2名の細胞検査士の細胞診判定精度について、直接塗抹標本とTP標本(TP-coat slide)の間において、いずれの項目も有意な差を認めなかった。

考 察

SP法では、密度勾配試薬を用いて細胞材料から血液や粘液、炎症細胞などを遠心分離して取り除く一方、TP法ではフィルターに陰圧をかけ、不必要な物質を吸引廃棄し、必要な細胞を均質にフィルター上に収集する。しかし、TP法では検体中に血液や粘液、炎症細胞、壊死物などを多く含む場合、これらの成分がフィルター孔を詰まらせ、結果として観察対象となる上皮細胞がスライドガラスに塗抹されないことが報告されている⁴⁶⁾。

Hologic社では、溶血、タンパク質沈殿の防止、粘液の融解、細胞形態の保存のため、25%メタノール緩衝保存液であるCyLによる前処理を推奨している。その工程は、細胞材料が入っているCyL液の容器を数回転倒混和し、1200G、5分間遠心した後、すぐに細胞沈渣を細胞保存液であるPreservCyt®(Preserv)液が入ったバイアル内に回収し、30分以上固定するというものであった。われわれはそれをCyL処理「直後」とし、培養細胞を用い、その細胞沈渣に血液100 μL 添加における上述推奨CyL処理であるCyL処理「直後」を試みた結果、平均細胞数は195.4個であった。対照とし

たCyL処理「なし」(27.8個)に比べ、「直後」では有意に改善が見られた。さらに、経時的な検討において、CyL処理「1時間」では266.2個、「6時間」は148.6個、「24時間」では99.4個であった。CyL処理「1時間」は「直後」と比較し、有意ではないが高値であり、「6時間」および「24時間」よりも有意に高値であった⁷⁾。

したがって、不正出血を主訴とすることが多い子宮内膜細胞診においてTP法を日常業務で実施する場合、適切な溶血処理を行い、判定可能な細胞塗抹量を得ることは重要であり、本検討では、子宮内膜検体に対し、CyLでの溶血処理(混和後静置)1時間の後、TP標本作製した⁷⁾。

その結果、細胞集塊の長径(表1)では、非腫瘍性病変および腫瘍性病変ともに、TP-slideおよびTP-coat slide標本は直接塗抹標本よりも有意に小型を示した。この結果に関して、直接塗抹標本では、スライドガラスに採取器具を直接押し当て細胞を塗抹するが、TP標本では以下のように標本作製工程が多い;①採取材料を回収するため、CyL容器の底に採取器具を10回程度押し付け、さらに強くかき回す。②CyL容器を遠心後、細胞沈査をPreservに添加し、容器を転倒混和する。③バイアル中の細胞を均一に攪拌するため、細胞保存液容器が高速で回転する。④細胞をスライドガラスに転写・塗抹するため、細胞保存液中から細胞はメンブランフィルター膜に吸引される。

われわれは、その①から③の工程において、物理的な力が細胞集塊に加わるため、壊れ、小型化したものと推察した。標本作製原理の違いSP法においても同様に標本作製工程で種々の物理的な力が細胞集塊に加わるため、小型化することが報告されている^(10,11)。しかしながら、細胞集塊数および核重積(表1)に関し、非腫瘍性病変および腫瘍性病変でのTP-slideおよびTP-coat slide標本は直接塗抹標本と比較して、それぞれ有意な差を認めなかった。このことは単位面積当たりの細胞集塊数が同等であり、核の重積度も変わらないことを示しており、TP標本は直接塗抹標本と同等の品質を有すると考えられた。(図1, 2)。

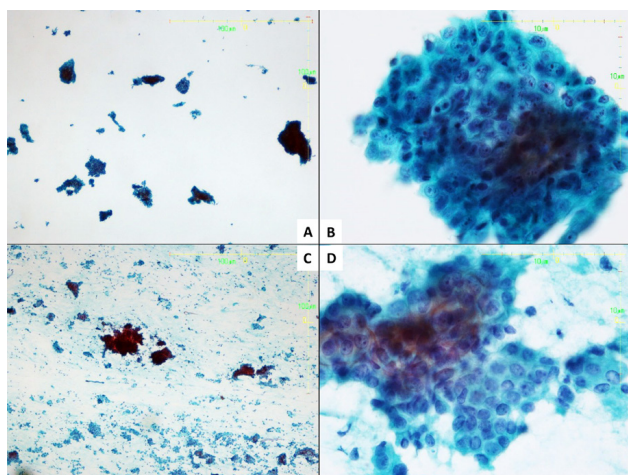


図1 腫瘍性病変, 類内膜癌Grade2

TP-coat slide(A)での背景は直接塗抹標本(C)よりも清明であるため、癌細胞集塊の確認が弱拡大でも容易である。強拡大におけるTP-coat slide(B)での癌細胞の観察は直接塗抹標本(D)よりも核小体など核所見の観察が明瞭である。(パパニコロウ染色, 対物レンズの倍率A,C:×4, B,D:×40)

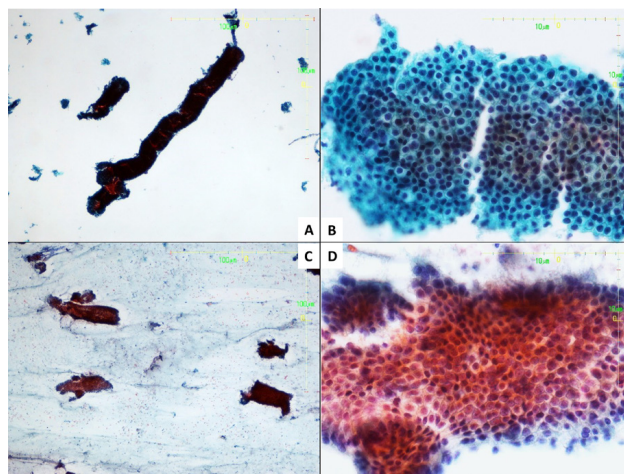


図2 非腫瘍性病変, 分泌期内膜

TP-coat slide(A)での背景が直接塗抹標本(C)よりも清明であり、周期性内膜特有の管状集塊の確認が弱拡大でも容易である。強拡大におけるTP-coat slide(B)での分泌期細胞の観察は直接塗抹標本(D)よりも蜂の巣状構造が明瞭である。(パパニコロウ染色, 対物レンズの倍率A,C:×4, B,D:×40)

また、TP標本作製時での細胞のメンブランフィルター上への収集について、材料中に血液などを多く含む場合、これらの成分がメンブランフィルターに付着し、結果として観察対象となる上皮細胞がスライドに塗抹されないことが報告されている⁽¹⁵⁾、単位面積当たりの細胞集塊数が同等であったことは、CyL1時間の溶血処理が適切であったことを裏付けていると考えられた。

TP法で使用するスライドガラスの種類について、非腫瘍性病変ではTP-coat slideが細胞集塊数および細胞長径において、有意差を認めないがTP-slideよりも高値であったこと、腫瘍性病変ではTP-coat slideが細胞長径および核重積において、有意差を認めないがTP-slideよりも高値であったことより、コーティングガラスがより適していると考えた。

次に、判定精度について比較したところ、感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率において、2名の細胞検査士いずれも直接塗抹標本とTP標本(TP-coat slide)の間において、有意な差を認めなかった(表2)。また、TP標本での判定精度について、Kippら⁽¹²⁾は、「陰性・異型細胞・陽性」の細胞診判定を用いたが、「異型細胞」を陽性と扱うかどうかによって、感度が67%~95%、特異度が97%~66%、陽性的中率が96%~83%、陰性的中率が62%~89%とかなりの変動を示し、今後、「異型細胞」判定の取り扱いが、癌を検出するために重要であると述べた。

一方、われわれの判定精度(2名の細胞検査士の判定)は、感度76.9%~100%、特異度92.0%、陽性的中率83.3%~

86.7%, 陰性的中率88.5%~100%と, Kippらに比べて高い精度を示した(表2)。その理由として, われわれも細胞診判定に「異型子宮内膜細胞」を設けているが, 「異型子宮内膜細胞-意義不明」は陰性に, 「異型子宮内膜細胞-子宮内膜異型増殖症などを除外できない」は陽性としており⁸⁹⁾, 「異型細胞」の判定基準がKippらよりも明確であるためと考えられた。それらのことより, TP標本(TP-coat slide)は直接塗抹標本と同じ判定方法が適用できることが示唆された。

以上のことより, 子宮内膜細胞診におけるTP標本作製には, CyLによる溶血処理1時間の運用が有用であることが確認できた。

引用文献

- 1) Goodman A, Hutchinson M.(1996): Cell surplus on sampling devices after routine cervical cytologic smears: A study of residual cell population, J Reprod Med, 41, 239-241.
- 2) van der Graaf Y, Vooijs GP, Gaillard HL, et al. (1987): Screening errors in cervical cytological screenings, Acta Cytol, 31, 1434-438.
- 3) Beerman H, van Dorst EBL, Kuenen-Boumeester V, et al. (2009): Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. Gynecol Oncol, 112, 572-576.
- 4) Bentz JS, Rowe LR, Gopez EV, et al. (2002): The unsatisfactory ThinPrep Pap test: Missed opportunity for disease detection?. Am J Clin Pathol, 117, 457-463.
- 5) Sweeney BJ, Haq Z, Happel J, et al. (2006): Comparison of the effectiveness of two liquid-based Papanicolaou systems in the handling of adverse limiting factors. Such as excessive blood, Cancer, 108, 27-31.
- 6) Kenyon S, Sweeney BJ, Happel J, et al. (2010): Comparison of BD SurePath and ThinPrep Pap systems in the processing of mucus-rich specimens, Cancer, 118, 244-249.
- 7) Norimatsu Y, Ohsaki H, Masuno H, et al. (2014): Efficacy of CytoLyt® Hemolytic Action on ThinPrep® LBC Using Cultured Osteosarcoma Cell Line LM8, Acta Cytologica, 58, 76-82.
- 8) Yanoh K, Norimatsu Y, Hirai Y, et al. (2009): New diagnostic reporting format for endometrial cytology based on cytoarchitectural criteria, Cytopathology, 20, 388-394.
- 9) Yanoh K, Hirai Y, Sakamoto A, et al. (2012): New

terminology for intrauterine endometrial samples: a group study by the Japanese Society of Clinical Cytology, Acta Cytol, 56, 233-241.

- 10) 町田大輔, 西村由香里, 横山大, 他. (2008): Thinlayer 標本による子宮内膜細胞診の評価. 日臨細胞誌, 47, 95-102.
- 11) 戸田誠二, 片桐丘充, 小杉久良, 他. (2014): SurePath法による子宮内膜液状検体細胞診(liquid-based cytology, LBC)標本作製における細胞集塊構築保持に適切な手法の確立 従来の自動法及び用手法と自施設改良法における比較検討, 新潟県厚生連医誌, 25, 74-79.
- 12) Kipp BR, Medeiros F, Campion MB, et al. (2008): Direct uterine sampling with the Tao brush sampler using a liquid-based preparation method for the detection of endometrial cancer and atypical hyperplasia: a feasibility study, Cancer, 114, 228-35.

要 旨

主訴が不正出血とする子宮内膜細胞診において, 液状化検体細胞診法の一つであるThinPrep(TP)法を実施する場合, 適切な赤血球除去や細胞塗抹量の確保は必須であると考え, TP法での溶血処理法としてCytoLyt液(CyL:25%メタノール緩衝液)に注目し, 子宮内膜検体に対し, 溶血処理を1時間行った後, TP標本作製し, 直接塗抹標本と比較した。その結果, TP標本は細胞集塊長径では, 直接塗抹標本よりも有意に小型化を示したものの, 細胞集塊数および核重積性では直接塗抹標本との間で有意差を認めなかった。また, 細胞診判定精度について, 2名の細胞検査士いずれも直接塗抹標本とTP標本(TP-coat slide)の間において, 有意な差を認めなかったことより, TP標本は直接塗抹標本と同等の品質を有するとともに, 直接塗抹標本と同じ判定方法が適用できることを示唆していると考えられた。以上のことより, 子宮内膜細胞診におけるTP標本作製には, CyLによる溶血処理1時間の運用が有用であることが確認できた。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反はない。