原 著

甲状腺穿刺吸引細胞診における多パラメーター 解析の診断学的意義

岐阜大学医学部第3内科¹⁾, 岐阜日赤病院外科²⁾, 岐阜大学医学部第1病理³⁾島 寛人¹⁾ 三浦 清¹⁾ 多羅尾 信²⁾ 高橋 正宜³⁾

各甲状腺疾患について、細胞診所見に加えて核内細胞質封入体、細胞核長径、顕微分光測光法による核 DNA 量および細胞総蛋白量の計測を行った。核長径は、乳頭癌 11 例で、 $7.8 \pm 1.4 \mu$ (mean $\pm$ SD) から $9.9 \pm 1.6 \mu$, 濾胞癌で、 $8.3 \pm 1.3 \mu$ および $9.4 \pm 1.9 \mu$, 未分化癌で、 $10.7 \pm 2.9 \mu$, 髄様癌で $8.5 \pm 1.6 \mu$, $9.0 \pm 1.8 \mu$ といずれも、腺腫、腺腫様甲状腺腫に比し増大したが、慢性甲状腺炎でも、その多形性を反映し増大傾向が示された。核内細胞質封入体は、良性疾患、濾胞癌には認められず、乳頭癌 11 例中 10 例、髄様癌 2 例中 1 例、また、未分化癌はその 1 例に陽性を示した。乳頭癌において、癌細胞に占めるその出現頻度は、それぞれ 0.4% から 2.6% で、出現頻度に関して他型のそれと有意差はなかった。核 DNA 量 : 細胞総蛋白量は、乳頭癌で、計測全例の平均が 2.51 ± 0.90 AU : 4.01 ± 2.35 AU, 濾胞癌で 2.72 ± 0.79 AU : 2.78 ± 0.99 AU, 未分化癌で 6.20 ± 4.39 AU : 6.70 ± 4.81 AU と、腺腫例の平均 2.28 ± 0.65 AU : 2.91 ± 1.37 AU に比較し、濾胞癌で細胞総蛋白量の減少を認めた以外はいずれも有意 ($P < 0.001$) に増加した。これらの客観的パラメーターの解析は、甲状腺腫瘍の鑑別診断に有意義と考えられる。

Key words : Thyroid—DNA content—Cellular protein content—Cytofluorometry—
Intranuclear cytoplasmic inclusion

は じ め に

甲状腺腫における診断には触診をはじめ、血清生化学、各種の画像診断法が用いられ、特に画像解析の進歩は著しい効果をあげているが、その確定診断としては、

Diagnostic evaluation of multi-parameter analysis in
fine needle aspiration biopsy cytology of the thyroid
Hiroto SHIMA, M.D. and Kiyoshi MIURA, M.D.
3rd Department of Internal Medicine, Gifu University
School of Medicine
Makoto TARAO, M.D.
Department of Surgery, Gifu Red Cross Hospital
Masayoshi TAKAHASHI, M.D., F.I.A.C.
1st Department of Pathology, Gifu University School
of Medicine

論文別刷請求先 ㊟502 岐阜市岩倉町3の36 岐阜日赤病院
検査部病理 島 寛人

昭和60年5月24日受付

昭和60年12月20日受理

今なお病理形態学的所見に負うところが多い。

従来、甲状腺腫の病理組織診断法としては、Open biopsy, Vim-Silverman 針による Needle biopsy などが行われてきた。これらの生検法は、それぞれ、観血的外科手術を要したり、盲目的生検法では合併症の危険を伴うものである²¹⁾。近年、これらにかわり、ほぼ 1 mm 径の細穿刺針を使用し、安全かつ簡便な細穿刺吸引生検細胞診 Needle Aspiration Biopsy Cytology (以下、ABC) が用いられ、その有用性が広く認識されるようになった。しかし、甲状腺癌の ABC では、細胞異型が軽度で、しばしば良性、悪性の診断に苦慮する症例に遭遇する。そこで、従来の光顕的細胞所見に加え、各種の客観的パラメーター解析による診断へのアプローチが、他臓器癌と同様に、甲状腺癌においても試みられてきた^{1,14,15,20,23,26,30)}。とりわけ、Caspersson⁵⁾により始められた核 DNA 量に関する顕微分光測光法は、その後 Fujita ら⁷⁾により、特異性の高い蛍光測光法に改良され、広く腫瘍学に

表 1 研究対象例の病理組織学的分類

慢性甲状腺炎	3
腺腫様甲状腺腫	3
良性腫瘍	37
濾胞腺腫	37
コロイド腺腫	33
管状腺腫	4
悪性腫瘍	16
乳頭癌	11
濾胞癌	2
未分化癌	1
髄様癌	2*
計	59

*捺印標本

において、診断のみならず、予後との関連²⁾などにおいて応用されており、甲状腺癌の細胞診における有用性も報告されてきた^{1,23,30)}。しかし、核 DNA 量のみからは、絶対的基準とはしがたいのが実情である。

今回著者らは、甲状腺の ABC について、その細胞診所見、特に核径、核内細胞質封入体（以下、核内封入体）出現頻度などの通常の観察法に加えて、蛍光顕微分光測光法による核 DNA 量と細胞総蛋白量（以下、総蛋白量）の同時測光を行い、その診断学的意義について検討を加えた。

研究対象ならびに方法

I. 研究対象

1982 年より 1983 年までの間に岐阜日赤病院において、ABC を行い、外科手術を施行した甲状腺腫 59 症例について、得られた細胞材料を用いた（表 1）。これらの症例中甲状腺腫瘍の病理組織学的分類は、甲状腺癌取り扱い規約¹⁹⁾により行った。

II. 穿刺吸引生検細胞診

穿刺法は 21 G（外径 0.81 mm）あるいは 22 G（外径 0.7 mm）の注射針と、10 ml 注射筒および細胞診用吸引ピストルを用いた。患者は仰臥位とし、頸部を伸展させ、穿刺時の嚥下運動を禁じた。穿刺局所をアルコール消毒後、非麻酔下に、左手指間に腫瘤を固定し、穿刺吸引を行った。抜去時陰圧を回復し、針内腔に得られた細胞材料は、注射筒に入れた少量の生理食塩水により、注射針より静かに圧出し、光顕用塗抹標本作製、ただちに 95% エタノールにより湿固定を行った。Giemsa 染色用標本は、冷風乾燥固定を行った。光顕用の染色法には、Papanicolaou 染色（以下、Pap. 染色）、PAS 反応、Giemsa 染色を用いた。

細胞診所見は、各染色標本を対比させ観察した。核長径、核内封入体の計測は、Pap. 染色標本上の細胞を対物油浸 100 倍を使用し、MTV テレビ装置（Olympus）および対物マイクロメーターにより行った。核長径は、1 視野 10 個を限度とし、おのおの 100 個計測、細胞診所見でのクロマチン構造は、細顆粒状、細網状、粗顆粒状、粗網状の 4 型に分類した²⁷⁾。核内封入体の計測は、細胞 1,000 個あたりの出現頻度およびその直径、核長径に占める核内封入体の割合（対核径比）、複数を有する割合、組織型別出現率などの検討を行った。

III. 蛍光顕微分光測光法による各甲状腺疾患の核 DNA 量および総蛋白量の定量

蛍光染色による標本背景の非特異的共染を避けるため、また、適当な細胞分散のため、穿刺材料をソルビトール加乳酸リンゲル液 10 ml 中に静かに圧出し、数回のシリジング操作後、1,500 回転、5 分間遠沈。血液、囊胞液などの混入の多い検体は、同様の洗滌操作を数回行った。得られた沈渣を無蛍光スライドガラスに可能な限り薄く塗抹し、ただちに Böhm ら⁴⁾の固定液（メタノール：ホルマリン：酢酸＝85：10：5）で室温 60 分間固定。固定後 100% エタノールで数回洗滌後、Fukuda ら⁸⁾の pararosanilin-Feulgen, ninhydrin-acriflavine-Schiff 反応による DNA-蛋白蛍光重染色を行った。染色標本を紫外線照射装置 LSPI（Olympus）により、blue 励起光および、green 励起光でおのおの 10 時間の後照射を行い、非特異蛍光を排除し^{8,11)}、落射蛍光顕微測光顕微鏡 QRFL（Olympus）および対物蛍光油浸レンズ 100 倍を用い、各標本上の上皮細胞 50～410 個の核 DNA 量と総蛋白量の同時測光定量を行った。核 DNA 量の定量は、green excitation filter 545 nm, barrier filter 580 nm, 総蛋白量の定量は、blue excitation filter 405 nm, barrier filter 515 nm をおのおの使用し、マイクロコンピュータにて散布図を作製した。なお、対照として同一標本上の多核白血球 30 個を測定し、その核 DNA 量（relative DNA content）、総蛋白量（relative protein content）をおのおの 2c, 2p として表した。また、得られた各甲状腺疾患の全 2 次元データをマイクロコンピュータ FM 11（富士通）を用い解析し、Mahalanobis の汎距離法^{*}による 95% 等確率長円（D²）を示す 2 変量管理図を作製した。

$$* D^2 = \frac{U_1^2 + U_2^2 - 2rU_1U_2}{1-r^2} \quad \text{ただし } U_1^2 = \frac{(x_1 - \mu_1)^2}{\sigma^2},$$

$$U_2^2 = \frac{(x_2 - \mu_2)^2}{\sigma^2}$$

(x_1 ＝核 DNA 量, x_2 ＝総蛋白量, r ＝相関係数, μ ＝平均, σ^2 ＝分散)

結 果

I. 穿刺吸引細胞診所見

1. 各甲状腺疾患の穿刺吸引細胞診所見

1) 腺腫 (adenoma)

濾胞腺腫 (follicular adenoma) は 37 例で, その組織学的亜分類は, コロイド腺腫 (colloid adenoma) 33 例, 管状腺腫 (tubular adenoma) 4 例であった。濾胞変性は, コロイド腺腫 17 例, 管状腺腫 1 例にみられた。穿刺吸引に際し, これら濾胞変性例では, しばしば半流動状, 暗褐色の血液変性物が採取された。これらの標本では, 上皮細胞成分は少なく, また, 変性による上皮細胞

写真 1 濾胞腺腫。小型類円形核より成るシート状配列 (Pap. 染色, $\times 857$)

の核濃縮, 細胞質の空胞変性などがみられた。他の細胞成分では, 多数の組織球性泡沫細胞が特徴的であった。非濾胞変性例では, 背景には, 赤血球および少数のリンパ球がみられる程度であり, 細胞壊死物質などは認められなかった。コロイド腺腫では, PAS 陽性を示すコロイドの増加があり, 細胞集塊内あるいは集塊外に認められた。細胞集塊は小型で, シート状配列を示した (写真 1)。5 例のコロイド腺腫において, 細胞数 100 個以上の大型集塊がみられた。また, これらの例では採取される細胞集塊数も増加した。管状腺腫では, 4 例とも細胞集塊は小型で, 3 例では小型濾胞状配列を示す小型集塊もよく認められた。孤立性上皮細胞は全例においてみられたが, そのほとんどは裸核状を呈した。細胞集塊における個々の細胞所見は, 細胞質は薄く淡青色で, 細胞境界は不鮮明であった。核形は類円形で, 核長径は $5.5 \pm 0.7 \sim 7.2 \pm 0.7 \mu$ (mean $\pm$ SD) で, 大小不同は少なかった (図 1)。核小体は, 全例において青染し, 単一で 2μ 以下であったが, 一部 2 次変性に起因する, 核小体膨大などの核異型を示すものがみられた (写真 2)。クロマチン構造はおおむね細顆粒状で均一な分布を示したが, 一部変性による粗顆粒状凝集が認められた。

2) 腺腫様甲状腺腫 (adenomatous goiter)

3 例ともコロイド量の増加傾向を認めた。細胞集塊は 100 個以下の細胞よりなる中等度の集塊が多く, シート状の規則性配列を示した。また, 一部, 少数の濾胞状配列を呈する小型集塊も認められた。個々の細胞所見は,

* Imprint smear

図 1 Pap. 染色標本における各甲状腺疾患の細胞核長径の分布

写真 2 濾胞腺腫。シート状配列を構成する個々の核の核小体は赤染しやや目立つ (Pap. 染色, $\times 2,142$)

写真 5 乳頭癌。乳頭状配列を示す細胞集塊 (Pap. 染色, $\times 857$)

写真 3 慢性甲状腺炎。多形性を示す好酸性変性上皮 (Pap. 染色, $\times 857$)

写真 6 乳頭癌。小型均一性の核よりなる密な魚鱗状配列 (Pap. 染色, $\times 857$)

写真 4 乳頭癌。著明な細胞質空胞変性上皮 (Pap. 染色, $\times 857$)

核は類円形を呈し、核長径は $6.0 \pm 0.6 \sim 6.6 \pm 0.8 \mu$ で均一性であった (図 1)。核小体はいずれの例でも目立たず、クロマチン構造は細顆粒状、均一分布を呈した。以上の細胞診所見から、腺腫様甲状腺腫と濾胞腺腫との鑑別は困難であった。

3) 慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis)

細胞診所見では、3例いずれにも、多数のリンパ球、

形質細胞のほか、リンパ濾胞由来の大型胚中心細胞が特徴的に出現した。上皮細胞は集塊をなし、核の軽度ないし中等度の大小不同を伴うシート状配列を示した。3例中2例では、少数の小型濾胞状配列もみられた。濾胞上皮では、細胞質は豊富で、核は類円形を呈したが、2例では、濾胞上皮の好酸性変性を認めた。これら好酸性変性細胞の細胞質はさらに豊富で顆粒状を呈し、しばしば長径 15μ 以上に達する大型核と、肥大赤染性、単一性の核小体を有した。クロマチン構造は細顆粒状均一分布を呈した (写真 3)。核長径は $7.1 \pm 1.2 \sim 9.2 \pm 2.0 \mu$ であった (図 1)。

4) 乳頭癌 (papillary carcinoma)

11例中2例では嚢胞変性を認め、これらの例の細胞診所見では、組織球性泡沫細胞、リンパ球、多核白血球などが出現し、ときに癌細胞の著明な空胞変性 (写真 4) や、細胞質の PAS 陽性所見などを認めた。嚢胞変性を示さない9例ではいずれも、腺腫例に比較し、cellularityが高く、結合性の強い大型の細胞集塊が多数出現した。乳頭状配列 (写真 5) は、いずれの例でも認められたが、9例中6例ではむしろ、核密度の高いシート状配列

表2 甲状腺悪性腫瘍の細胞学的所見

Case	年齢, 性	出現細胞数	細胞集塊の大きさ	配列	vertical chromatin ridge	核小体数	細胞質空胞変性	細胞壊死物質	多核巨細胞
乳頭癌									
1	29, m	+	小	pap	—	1	+++	+	—
2	30, f	+	小	pap	++	1	++	—	+
3	44, f	+++	中	sht > pap	—	1	+	—	—
4	36, f	+	小	sht > pap	++	1~2	—	—	+
5	31, f	+	大	sht > pap	+++	1	—	—	+
6	48, f	+++	中	pap > sht	+++	1~3	+	+	++
7	27, m	+++	大	sht > pap	+	1~2	+	+	+
8	35, f	+++	大	sht > pap	++	1	—	—	+
9	76, f	+++	大	pap > sht	++	1	—	—	—
10	42, f	+++	大	pap > sht	++	1	—	—	—
11	72, f	+++	大	sht > pap	++	1~3	—	—	—
濾胞癌									
1	56, f	+++	小	sht > fol	—	1~3	—	—	—
2	28, f	+++	中	fol > sht	—	1	—	—	—
未分化癌									
1	56, m	+++	小	crow > sht	+	1~5	+	++	—

m: 男性, f: 女性. 細胞集塊の大きさ, 小: <50, 中: 50~100, 大: >100. 配列, pap: 乳頭状, fol: 濾胞状, sht: シート状, crow: 不整重積状. —: 認めず, +: 少数, ++: 中等度, +++: 多数

写真7 乳頭癌. 癌細胞核にみられたクロマチンの線状凝集 (vertical chromatin ridge) (Pap. 染色, ×857)

(写真6)が多く出現した(表2). これらのシート状配列を呈する細胞集塊では, N/C比は高く, 良性のそれとは明らかな差を示した. いずれの例でも裸核状細胞もよく認められた. 個々の細胞の核は, 核形不整, 多核などは示さず, 類円形で, 核長径は, $7.8 \pm 1.4 \sim 9.9 \pm 1.6 \mu$ であった(図1). 癌細胞核におけるクロマチンの線状凝集(vertical chromatin ridge, 写真7)は, 11例中9例によく認められた(表2). クロマチン構造は, 細顆粒状から細網状を呈し, 変性の強い細胞では粗顆粒状を示した. 11例中6例でしばしば赤染する1~3個の核小体を認めたが, 大きさは 2μ 以下であった. 多核巨細胞は,

写真8 濾胞癌. コロイドを含む小型濾胞状配列 (Pap. 染色, ×857)

11例中6例に出現した. ほかの甲状腺悪性腫瘍も含め, これらのABCにおける所見を表2に示した.

5) 濾胞癌 (follicular carcinoma)

2例とも cellularity は高く, 細胞集塊は小型濾胞状から大型シート状配列を示すものまでさまざまであった. 組織学的に索状から小型濾胞状構造を示す例では, 重積性のある濾胞状の細胞集塊がみられた(写真8). シート状集塊では, 腺腫例のそれに比し, 高い細胞密度および, 極性の不整な配列が認められた(写真9). 組織学的に高分化な1例では, 腺腫に比し, 核径の増大を示すものの, 細胞集塊もシート状配列が主で, 極性の乱れもな

写真 9 濾胞癌。極性の不整なシート状配列
(Pap. 染色, $\times 2,142$)

写真 10 未分化癌。紡錘形を呈する癌細胞の核周囲明庭および核内細胞質封入体 (Pap. 染色, $\times 857$)

く、個々の核所見も、核異型、核小体肥大などは認められないところから、なお鑑別は困難であった。核長径はそれぞれ $8.3 \pm 1.3 \mu$, $9.4 \pm 1.9 \mu$ であった (図 1)。核小体は不明瞭で、クロマチン構造は細顆粒状で均一分布を呈した。

6) 未分化癌 (anaplastic carcinoma)

組織学的には多形細胞癌で、その ABC では、多数の異型細胞が出現し、小型で結合性疎な不整細胞集塊のほか、孤立性癌細胞も多数認められた。細胞質は比較的豊富で、紡錘形を呈し、空胞変性や、核周囲明庭もみられた。多核化も目立ち、核形も円形から不整形と多様であり、核長径は $10.7 \pm 2.9 \mu$ (図 1) で、著明な大小不同を示した。クロマチンは、細網状から粗網状で、不均一な

写真 11 乳頭癌。核内細胞質封入体
(Pap. 染色, $\times 2,142$)

表 3 各甲状腺悪性腫瘍における核内細胞質封入体の出現頻度とその性状

Case	頻度 (%)	個数 (%)*	大 き さ (mean $\pm$ SD, μ)	対核径比
乳 頭 癌 1	2.5	1 ~ 2 (12)	4.1 ± 1.8	0.50
2	1.6	1 ~ 2 (6)	3.4 ± 1.2	0.46
3	1.3	1 ~ 2 (8)	3.6 ± 1.0	0.38
4	1.0	1 ~ 2 (10)	5.0 ± 1.8	0.52
5	2.6	1 ~ 5 (8)	4.6 ± 1.3	0.51
6	1.4	1 ~ 4 (14)	5.2 ± 1.9	0.51
7	0.6	1 ~ 2 (17)	3.1 ± 1.1	0.38
8	1.3	1 ~ 2 (8)	4.5 ± 1.7	0.50
9	0.4	1 ~ 2 (25)	4.1 ± 1.6	0.42
10	0.5	1 (0)	3.4 ± 1.6	0.35
11	0			
平 均	1.3	1.1 (9)	4.2 ± 1.7	0.45
濾 胞 癌 1	0			
2	0			
未分化癌 1	0.4	1 (0)	14.5 ± 11.0	0.76
髓 様 癌 1**	4.4	1 ~ 5 (41)	5.1 ± 2.8	0.51
2**	0			

* 2 個以上の核内細胞質封入体を有する頻度, ** 捺印標本

分布を示した。核小体はしばしば肥大赤染し、不整形で 1~5 個有した (写真 10)。

2. 各甲状腺疾患における核内封入体の検討

核内封入体は, Pap. 染色標本において, 核内に核小体とは明らかに異なり, 境界明瞭で, 辺縁は核縁類似所見を呈する円形ないし類円形の灰青緑色から灰青色に染まる構造物である (写真 11)。Giemsa 染色では, 細胞質と同程度ないしやや明るく好塩基性に染色され, PAS 反応では陰性であった。また, 多くは核内に単一に認められたが, ときに複数を有する細胞もあり, 最多は, 乳頭癌および髄様癌で, おおの 5 個認められた (表 3)。各甲状腺疾患別のその出現率は, 乳頭癌 11 例中 10 例に, 未

表 4 各甲状腺疾患における核内細胞質封入体の組織型別出現率

組 織 型	例数	出現率(%)
慢性甲状腺炎	3	0
腺腫様甲状腺腫	3	0
濾胞腺腫	37	0
乳頭癌	11	91
濾胞癌	2	0
未分化癌	1	100
髄様癌	2*	50

*捺印標本

分化癌の 1 例および髄様癌 2 例中の 1 例に認められたが, 濾胞癌およびほかの良性疾患では陰性であった (表 4)。陽性例について, 癌細胞 1,000 個あたりのその頻度と直径, 対核径比などの計測値 (表 3) では, 乳頭癌で, 頻度は 0.4~2.6%, 全例の平均は 1.3%, おおのこの直径は 3.1~5.2 μ , 全例平均は 4.2 μ であった。対核径比は 0.35~0.52, 平均は 0.45 であった。未分化癌では, 頻度は 0.4%, 直径は 14.5 μ と乳頭癌に比し大きく, 対核径比は 0.76 で増大した。髄様癌 1 例では, その頻度は 4.4% と最多で, その直径は 5.1 μ , 対核径比は 0.51 であった。

II. 各甲状腺疾患における核 DNA 量および総蛋白量

良性甲状腺疾患では, いずれも cellularity が低く, また, 細胞質の保持が不良である場合が多く, 計測細胞数は悪性甲状腺疾患に比し限られた。良性, 悪性を問わず, 濾胞液を含む穿刺材料では, 数回の等張液による洗滌にもかかわらず, 背景の非特異的共染, あるいは細胞変性のため計測不能であった。

慢性甲状腺炎では, 核 DNA 量は 2.21 ± 0.63 AU (mean $\pm$ SD, arbitrary unit), 2c 域に major peak を有した。総蛋白量は, 2.60 ± 0.97 AU (mean $\pm$ SD), 2p 域に major peak を有し (図 2, 表 5), 両パラメーターは有意 ($P < 0.05$) な相関を示した。

図 2 各甲状腺疾患における核 DNA 量および細胞総蛋白量散布図

表 5 蛍光顕微分光測光法による各甲状腺疾患の核 DNA 量および細胞総蛋白量

		DNA mean $\pm$ SD (AU)	Protein mean $\pm$ SD (AU)	相関係数
慢性甲状腺炎		2.21 $\pm$ 0.63	2.60 $\pm$ 0.97	0.311
腺腫様甲状腺腫		1.81 $\pm$ 0.50	2.53 $\pm$ 0.84	0.188
濾胞腺腫	1	2.09 $\pm$ 0.30	3.08 $\pm$ 1.60	0.693
	2	2.40 $\pm$ 0.67	2.95 $\pm$ 1.30	0.651
	3	2.25 $\pm$ 0.83	2.66 $\pm$ 1.27	0.438
平 均		2.28 $\pm$ 0.65	2.91 $\pm$ 1.37	0.522
乳頭癌	1	2.61 $\pm$ 0.66	5.38 $\pm$ 2.70	0.819
	2	2.22 $\pm$ 0.95	2.69 $\pm$ 1.65	0.777
	3	2.35 $\pm$ 0.78	3.79 $\pm$ 1.85	0.522
	4	2.83 $\pm$ 0.93	3.87 $\pm$ 2.36	0.420
	5	3.11 $\pm$ 1.10	5.37 $\pm$ 2.19	0.755
平 均		2.51 $\pm$ 0.90*	4.01 $\pm$ 2.35**	0.641
濾胞癌		2.72 $\pm$ 0.79*	2.78 $\pm$ 0.99***	0.414
未分化癌		6.20 $\pm$ 4.39*	6.70 $\pm$ 4.81**	0.836

* 濾胞腺腫核 DNA 量の平均値に対して有意 ($P<0.001$, t-test)** 濾胞腺腫総蛋白量の平均値に対して有意 ($P<0.001$, t-test)

*** 濾胞腺腫総蛋白量の平均値に対して有意差を認めない

腺腫様甲状腺腫では、核 DNA 量は 1.81 ± 0.50 AU, 2c 域に major peak を示し、総蛋白量は、 2.53 ± 0.84 AU, major peak は 2p 域であったが、有意な相関は示さなかった (図 2, 表 5).

濾胞腺腫では、3 例が計測可能であったが、いずれも孤立性上皮細胞は少なく、計測細胞は限られた。各例における核 DNA 量は、 $2.09\pm0.30\sim2.40\pm0.67$ AU であり、全例の平均は 2.28 ± 0.65 AU, major peak はいずれも 2c 域であった。総蛋白量は、 $2.66\pm1.27\sim3.08\pm1.60$ AU, major peak はいずれも 2p 域であったが、1 例では、それに加え 4p 域に minor peak を示した (図 2, 表 5)。両パラメーターの相関はいずれも有意 ($P<0.01$) であった。

乳頭癌では、各症例の核 DNA 量計測値は、 $2.22\pm0.95\sim3.11\pm1.10$ AU, 全例平均は 2.51 ± 0.90 AU であった。総蛋白量はそれぞれ $2.69\pm1.65\sim5.38\pm2.70$ AU と、核 DNA 量に比し、症例間の変動が大きく、全例平均は 4.01 ± 2.35 AU であった (図 2, 表 5)。両パラメーターの相関はいずれも有意 ($P<0.01$) であった。

濾胞癌では、1 例に計測可能であった。その核 DNA 量は 2.72 ± 0.79 AU, 高 2c 域に major peak を示した。総蛋白量は、 2.78 ± 0.99 AU, 2p 域に major peak を示し、両者の相関は有意 ($P<0.01$) であった (図 2, 表 5)。

未分化癌では、孤立性癌細胞が豊富であった。また、その測定に際し、多核細胞も 1 個として計測した。核

DNA 量は 6.20 ± 4.39 AU とほかのいずれの例よりも高値で、明らかな peak をもたない異数性 aneuploidy を示した。総蛋白量も 6.70 ± 4.81 AU と高値で、aneuploidy であった (図 2, 表 5)。両者の相関は有意 ($P<0.01$) であった。

未分化癌細胞の核 DNA-蛋白蛍光重染色における核 DNA 量および蛋白特異蛍光像を写真 12 に示した。

これら各甲状腺疾患の両パラメーターの計測全データについての Mahalanobis の汎距離法による 2 変量管理図 (図 3) では、慢性甲状腺炎および腺腫様甲状腺腫の両パラメーターの計測値の 95% 確立散布範囲は、近似した。濾胞癌のそれは、良性疾患に比較し、やや右方への偏倚を示した。濾胞腺腫では、慢性甲状腺炎、腺腫様甲状腺腫、濾胞癌に比し、上方へ偏倚する散布範囲を示した。乳頭癌では、前 4 者いずれよりもやや広範な散布であったが、総蛋白量の増量を示す上方への偏倚が著明であり、濾胞癌との対比では、両者とも核 DNA 量は近似するが、乳頭癌では総蛋白量の増量がより顕著であった。未分化癌は、ほかのいずれの甲状腺疾患とも類似しない、両パラメーターの広範な散布性を示した。

考 案

甲状腺腫の ABC は、1952 年の Söderström の報告²⁵⁾をはじめ、以後、多数の報告^{13, 18, 28)}があり、最近本邦に

写真 12 未分化癌細胞における蛍光重染色像. ninhydrin-acriflavine-Schiff 反応による緑色蛋白特異蛍光像(左)および pararosanilin-Feulgen 反応による赤色核 DNA 特異蛍光像(右) ($\times 1,200$)

図 3 Mahalanobis の汎距離法による2変量管理図. 色別された各曲線は各甲状腺疾患における核 DNA 量および細胞総蛋白量の 95% 等確立長円を示す

においても, 多くの施設でその有用性が認識され, 行われている。

I. 甲状腺腫の ABC について

甲状腺腫瘍は, 乳腺腫瘍と同様に, 体表より触知可能で, その ABC も容易である。また, しばしば問題とされる針穿刺の安全性についても, Berg ら⁹⁾は, 乳癌の ABC 例の長期生存率と非穿刺例のそれとの間に差を認めないことをあげており, 甲状腺癌の ABC に関する報告でも needle tract implantation および dissemination は経験されていない。この点について, Miller ら²¹⁾は,

細針により採取された腫瘍細胞の viability の低下を示唆している。以上より細針による ABC は安全であると考えられるが, より慎重に, 穿刺針は可能なかぎり細針を用いるべきであろう。穿刺針は, 実際には 21~23 G の細針が適当である。本研究において, 21 G の細針による ABC では, 細胞構築, cellularity も十分であった。甲状腺腫では, しばしば嚢胞変性を示すことがあり, Hammer ら⁹⁾は, 甲状腺癌の 33% に嚢胞変性を報告している。本研究でも, 腺腫 37 例中 18 例, 乳頭癌 11 例中 3 例に嚢胞変性を認めたが, これらの例では, 単に嚢胞液

の ABC のみでは、腫瘍細胞数の減少、細胞変性、異型を示す組織球などの増加等による、疑陰性の一因となりうと思われた。嚢胞変性例の診断精度の向上のためには、膜濾過法²⁷⁾などによる確実な細胞収集が必要であろう。また、穿刺部位については、事前の各種画像診断法^{9,22)}による嚢胞の質的性状の把握、あるいは超音波ガイド下による穿刺法などの応用も今後の検討課題であろう。

II. 各甲状腺疾患の細胞診所見について

慢性甲状腺炎は、組織学的に散在性と瀰漫性に分類され、後者では、諸種炎症性細胞浸潤、リンパ濾胞の形成、濾胞上皮の好酸性変性などの典型的な橋本病像を示すものから、“硬化型、fibrous variant”¹⁷⁾まで、組織学的に広い spectrum を示す²¹⁾。これら慢性甲状腺炎における細胞診所見は、その個々の組織像の要素、すなわち、①炎症性細胞浸潤の程度、②濾胞上皮の多形性、③間質の線維化の程度などを反映するものである^{16,24)}。本研究の慢性甲状腺炎3例でも、諸種炎症性細胞の出現は、ほかの甲状腺疾患に比し、明らかに増多したが、症例間のそれらの多寡は、それぞれの組織像をよく反映するものであった。濾胞上皮の核径計測値は、ほかの良性疾患に比べ増大し、症例間の差違を示した。これは各症例における濾胞上皮の変性の程度とよく相関し、上皮の多形性に起因するものと思われた。

腺腫様甲状腺腫および濾胞腺腫における細胞診所見では、前者において、濾胞上皮数の減少傾向が認められたが、明らかな鑑別点は、諸家による報告^{13,21,28,30)}と同様、みだし得なかった。核径の計測値も核の均一性を示した。

乳頭癌における細胞診所見については、多くの報告^{13,18,21,22,28,29)}があり、その細胞学的診断基準もほぼ確立してきていると思われる。乳頭癌の特徴的細胞診所見として、Kini ら¹⁸⁾は下記の6項目をあげている。すなわち、① papillary fronds、② monolayered sheets、③ tissue fragments、④ intranuclear cytoplasmic inclusions、⑤ psammoma bodies、⑥ multinucleated giant cells である。上記所見に加え、癌細胞の核径も、慢性甲状腺炎を除くほかの良性疾患に比し、増大した。また、多核巨細胞と同様に、非特異的所見ではあるが、Miller ら²¹⁾の記載した“vertical chromatin ridge”も、比較的よくみられる所見と思われた。以上の所見に加え、細胞診における一般的悪性徴候の重要性は論をまたない。乳頭癌は、甲状腺悪性腫瘍の76%²²⁾と、最も高頻度にみられる癌であり、その早期診断におけるABCの意義は、今後さらに増大していくものと思われる。

濾胞癌は、高分化型では“malignant adenoma”¹²⁾と称されるごとく、組織学的にも腺腫との鑑別が困難であり、この範疇の細胞診に関する諸家の報告^{13,21,28,29)}でも、その限界を指摘されている。本研究の2例の濾胞癌は、いずれも被膜への浸潤を示すものであったが、1例は“中分化型”¹²⁾濾胞癌であり、その細胞診所見も、クロマチン量の増加、核小体の肥大、赤染などの異型を示した。ほかの1例は、“高分化型”¹²⁾であり、その細胞診所見からは、腺腫との鑑別は困難と思われた。

多形細胞型未分化癌の細胞診所見は、最も特徴的であり、一般的悪性徴候を示すところから、その診断も容易であり、むしろABCの非侵襲性、迅速性が重要であろう。

III. ABCにおける核内封入体について

1965年のKasten ら¹⁶⁾の記載にはじまる甲状腺悪性腫瘍の核内封入体は、その成因として、腫瘍細胞の異常核分裂が示唆されており²⁴⁾、現在ではそのABCにおける重要な悪性徴候の1つと考えられている。本研究では、乳頭癌の91%に陽性であったが、これは、ほかの報告^{10,18)}と同様に高率であった。また、個々の例における乳頭癌細胞中のその陽性頻度は、平均1.3%と花輪ら¹⁰⁾の報告と類似した。

核内封入体は、乳頭癌のみならず、ほかのいずれの癌にもその出現が報告されている²¹⁾。本研究でも、濾胞癌を除く甲状腺悪性腫瘍に陽性であったが、全甲状腺悪性腫瘍に占める乳頭癌の頻度、組織型別陽性率などからかんがみても、実際のABCにおけるその出現が乳頭癌を一義的に示唆するという意見^{13,18,21,29)}は、妥当と思われる。

IV. 各甲状腺疾患における核DNA量および総蛋白量について

乳頭癌について、阿部ら¹⁾、矢谷ら³⁰⁾は、核DNA量の増量を報告しており、本研究の乳頭癌例でも、腺腫例に比較し、有意な増量を示した。一方、Johannessen ら¹⁴⁾は、この点に関して否定的である。

濾胞癌の核DNA量について、Lukács ら²⁰⁾、Rabenhorst²³⁾は、本研究と同様に、その増量を報告している。しかし、Sprenger ら²⁶⁾、Johannessen ら¹⁵⁾は、良性疾患においてもその増量傾向を指摘し、その診断学的意義については否定的である。

濾胞腺腫における核DNA量は、癌との比較において有意であったが、乳頭癌例中でも、腺腫より低値を示す例もみられ、核DNA量のみからの鑑別は、慎重を期すべきであろう。

総蛋白量について、Caspersson ら⁶⁾は、悪性腫瘍にお

けるその増量傾向を指摘し、腫瘍細胞の核小体関連クロマチンの障害を、総蛋白量の変動が間接的に反映することを示唆している。また、Harada ら¹¹⁾は、子宮頸癌における核 DNA 量および総蛋白量の両パラメーターの間に相関を指摘し、その生物学的悪性度と両パラメーターの増量傾向に関連性を示すとしている。本研究では、乳頭癌、未分化癌で腺腫との間に有意差を認めたが、濾胞癌では、むしろ腺腫より減量を示しており、この面からの鑑別には、さらに、核蛋白と non-histon 蛋白に分画定量する必要性が示唆された。

乳頭癌および未分化癌では、細胞採取性が良く、細胞質の良く保たれた孤立性細胞を得ることが可能であった。しかし、ほかの良性疾患では、cellularity、細胞質の脆弱性などの点から、十分な計測標本が得がたく、対象症例、計測細胞数が限定された。これら固形腫瘍の preparation の確立は、今後の顕微分光測光法における課題であろう。

本研究の蛍光顕微分光測光法による各甲状腺疾患の両パラメーターの測定結果について、なお、preparation に起因する症例間の測定値の変動、誤差などを否定することはできないが、従来の細胞診所見における腫瘍細胞の主観的なクロマチン量、核細胞質量の変動を、これらの測光法による客観化により、詳細、正確な解析が可能となる点で有意義と考えられた。

結 語

従来の Pap. 染色標本における各甲状腺疾患について、甲状腺癌の診断に有用な、特徴的細胞診所見について検討した。加えて、客観的パラメーターとして、各甲状腺疾患における核長径の計測、核内封入体出現頻度、および蛍光顕微分光測光法による核 DNA 量、総蛋白量の測定を行い、疾患相互の比較検討を行った。これら多パラメーターの解析が、各甲状腺疾患、とりわけ癌の ABC において有意義であり、今後、この分野におけるさらに多くのパラメーターの検索、診断への応用が必要と思われる。

本論文の要旨は、第24回日本臨床細胞学会総会において発表した。

Summary

Cytodiagnostic and cytofluorometric measurements of combined nuclear DNA and cellular protein contents were performed on epithelial cells taken by needle aspiration

from 59 patients with neoplasms or other benign lesions of the thyroid. Analysis of other parameters, such as nuclear size and appearance of intranuclear cytoplasmic inclusions, was carried out on the malignant neoplasms. The conclusions of this study are as follows:

1. General cytologic property and nuclear size (100 cells)

Papillary carcinoma was distinguished by a papillary arrangement in all of 11 cases, and their nuclear size ranged from $7.8 \pm 1.4 \mu$ to $9.9 \pm 1.6 \mu$ (mean $\pm$ SD). Two cases of follicular carcinoma, which were more or less characterized by follicular pattern, were $8.3 \pm 1.3 \mu$ and $9.4 \pm 1.9 \mu$ in nuclear size. Anaplastic carcinoma, though only one case, showed marked nuclear atypism and anisonucleosis, and measured $10.7 \pm 2.9 \mu$ in nuclear size. In 2 cases of medullary carcinoma, their nuclei measuring $8.5 \pm 1.6 \mu$ and $9.0 \pm 1.8 \mu$ in nuclear size, were in the same range as those in the other types. Thirty seven cases of follicular adenoma resembled follicular carcinoma so far as morphometry concerned, and their nuclei varied $5.5 \pm 0.7 \mu$ to $7.2 \pm 0.7 \mu$ in nuclear size. Three cases of adenomatous goiter were also similar to follicular adenoma in cytological features, their nuclear size ranged from $6.0 \pm 0.6 \mu$ to $6.6 \pm 0.8 \mu$. Chronic thyroiditis was studied in 3 cases, the epithelial cells were associated with a number of various inflammatory cells. In general, oxyphilic cells exhibited rather striking nuclear atypism. The nuclei disclosed fairly variable sizes ranging from $7.1 \pm 1.2 \mu$ to $9.2 \pm 2.0 \mu$.

2. Intranuclear cytoplasmic inclusions

Inclusions were observed in 10 cases (91%) of 11 papillary carcinomas. The frequency of inclusions ranged from 0.4% to 2.6%. They were also observed in one of one anaplastic carcinoma and one of 2 medullary carcinomas, and frequencies of which were 0.4% and 4.4% respectively. No inclusions could be found either in the benign lesions or in follicular carcinomas.

3. Nuclear DNA and cellular protein

Both DNA versus protein contents (mean $\pm$ SD) were 2.21 ± 0.63 AU (arbitrary unit) : 2.60 ± 0.97 AU in chronic thyroiditis, 1.81 ± 0.50 AU : 2.53 ± 0.84 AU in adenomatous goiter, 2.28 ± 0.65 AU : 2.91 ± 1.37 AU in follicular adenoma, 2.51 ± 0.90 AU : 4.01 ± 2.35 AU in papillary carcinoma, 2.72 ± 0.79 AU : 2.78 ± 0.99 AU in follicular carcinoma, and 6.20 ± 4.39 AU : 6.70 ± 4.81 AU in anaplastic carcinoma. Discriminant control chart based on Mahalanobis' generalized distance of papillary carcinoma and anaplastic carcinoma showed wider distribution in the protein content than those of other benign lesions and

follicular carcinoma. In the anaplastic carcinoma, the discriminant control chart was that distributed more extensively than in all the other thyroid lesions.

Cytofluorometric measurements of combined nuclear DNA and cellular protein contents in addition to other parameters, i.e., nuclear size and intranuclear cytoplasmic inclusions, were considered to be useful as the objective parameters, especially in aspiration biopsy cytology of the thyroid lesions.

文 献

- 1) 阿部庄作・他：核 DNA 量による甲状腺腫穿刺細胞診断，日臨細胞誌，20：8～14，1981.
- 2) Auel, G.U., et al. : Comparison of DNA distributions in primary human breast cancers and their metastases, *Europ. J. Cancer*, 16 : 273～278, 1980.
- 3) Berg, J.W., et al. : A late look at the safety of aspiration biopsy, *Cancer*, 15 : 826～827, 1962.
- 4) Böhm, N., et al. : DNA in human tumors; a cytophotometric study, *Curr. Top. Pathol.*, 60 : 151～219, 1975.
- 5) Caspersson, T. : Cell growth and cell function, Norton, New York, 1950.
- 6) Caspersson, T., et al. : Cytochemical differences between mammalian cell lines of normal and neoplastic origins, *Exp. Cell Res.*, 32 : 553～565, 1963.
- 7) Fujita, S., et al. : Simultaneous measurement of DNA content and grain count on an autoradiographs of Feulgen stained cells, *Histochemistry*, 40 : 155～163, 1974.
- 8) Fukuda, M., et al. : Combined protein and DNA measurements by the ninhydrin-Schiff and Feulgen techniques, *Histochemistry*, 63 : 35～45, 1979.
- 9) Hammer, M., et al. : Cancer in cystic lesions of the thyroid, *Arch. Surg.*, 117 : 1020～1023, 1982.
- 10) 花輪孝雄・他：甲状腺疾患における核内封入体の臨床細胞学的検討，日臨細胞誌，18：302～311，1979.
- 11) Harada, K., et al. : Combined DNA and protein cytofluorometry of gynecological smears; —Quantitative identification of tumor cells and discrimination of intraepithelial neoplasia from invasive cancer—, *Acta Histochem. Cytochem.*, 14 : 24～34, 1981.
- 12) Hedinger, C., et al. : Histological typing of thyroid tumours, International histological classification of tumours, No. 11, World Health Organization, Geneva, 1974.
- 13) 庵原昭一・他：穿刺吸引細胞診からみた甲状腺癌の細胞診，日臨細胞誌，16：43～55，1977.
- 14) Johannessen, J.V., et al. : A flow cytometric DNA analysis of papillary thyroid carcinoma, *Lab. Invest.*, 45 : 336～341, 1981.
- 15) Johannessen, J.V., et al. : The diagnostic value of flowcytometric DNA measurements in selected disorders of the human thyroid, *Am. J. Clin. Pathol.*, 77 : 20～25, 1982.
- 16) Kasten, F.H., et al. : Cinematography, phase-contrast and fluorescence microscopy of human thyroid tumors in tissue culture with observations of virus like lesions, *Tex. Rep. Biol. Med.*, 23 : 337～347, 1965.
- 17) Katz, S.M., et al. : The fibrous variant of Hashimoto's thyroiditis, *Human Pathol.*, 5 : 161～170, 1974.
- 18) Kini, S.R., et al. : Cytopathology of papillary carcinoma of the thyroid by fine needle aspiration, *Acta Cytol.*, 24 : 511～521, 1980.
- 19) 甲状腺外科検討会編：甲状腺癌取扱い規約，金原出版，東京，1977.
- 20) Lukács, G.L., et al. : Cytofluorimetric measurements on the DNA contents of tumor cells in human thyroid gland, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 95 : 265～271, 1979.
- 21) Miller, J.M., et al. : Needle biopsy of the thyroid, pp. 2～125, Praeger, New York, 1983.
- 22) 小原孝男・他：甲状腺悪性腫瘍，ホルモンと臨，32：61～72，1984.
- 23) Rabenhorst, G. : The diagnostic value of the DNA content of fine needle biopsies of the thyroid gland, *Arch. B. Cell Pathol.*, 16 : 379～382, 1974.
- 24) Sobel, H.J., et al. : Nonviral nuclear inclusions, I. Cytoplasmic invaginations, *Path. Lab. Med.*, 87 : 179～192, 1969.
- 25) Söderström, N. : Puncture of goiters for aspiration biopsy, *Acta Med. Scand.*, 144 : 237～244, 1952.
- 26) Sprenger, E., et al. : Differential diagnosis between follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid by nuclear DNA determination, *Acta Cytol.*, 21 : 528～530, 1977.
- 27) Takahashi, M. : Color atlas of cancer cytology, 2nd ed., pp. 57～82, Igaku Shoin, Tokyo, New York, 1981.
- 28) 鳥屋城男：甲状腺腫の穿刺吸引細胞診—特にその病理組織像と細胞像の対比について—，日臨細胞誌，11：101～114，1972.
- 29) 矢谷隆一・他：甲状腺腫の擦過塗抹細胞診，日臨細胞誌，15：156～167，1976.
- 30) 矢谷隆一・他：甲状腺結節性病変における核 DNA 量解析の診断的意義，日臨細胞誌，20：1～7，1981.