原 著

自動固定標本作製装置開発のための基礎的検討

——第一報 メンブレンフィルター法の有効性について——

湘南鎌倉総合病院病理¹⁾, 杏林大学保健学部細胞診断学教室²⁾

同 病理学教室³⁾, 江東微生物研究所千葉病理細胞診研究所⁴⁾

佐久間香苗^{1,2)} 椎名 義雄²⁾ 飯島 淳子²⁾ 大河戸光章³⁾

多田 彊平⁴⁾

自動固定標本作製装置開発の基礎的検討の一環として、メンブレンフィルター法を採用した FIL CUP Super (FS) を用い、自然尿 78 例、穿刺吸引材料 100 例の通常塗抹標本および FS 標本について、検体の保存状態、集細胞効果、および随伴所見について比較検討した。

FS 標本は細胞変性の防止、集細胞効果、均一で背景の綺麗な標本の作製など、固定標本作製において考慮すべき点は通常の方法に比べ優れていた。しかし、吸引困難例に対する対応、吸引圧による細胞陥没防止策、適正な塗抹細胞量の決定、観察におけるフィルター孔の違和感、診断の副所見となる標本背景の消失、塗抹処理による細胞像の相違、染色標本の退色防止およびコスト高などの課題が明らかになった。

今回の基礎的検討において、FS 標本は種々の問題点はあるものの、それらは対処可能な範囲であり、自動固定標本作製装置へ導入可能な方法であることが明らかになった。

Key words : Urine——Fine needle aspirated material——Membrane filter——Automatically fixed preparation

I. 緒 言

細胞診は細胞採取、標本作製、スクリーニングおよび総合判定のすべての段階が適正に行われたとき、臨床側に有益な情報を提供できるものであり¹⁾、より精度の高い総合判定を導くために技術面へのフィードバックが繰り返され、診断学として体系づけられてきた。標準化は学問的背景が整ったところから行われるもので、細胞診においてはまず Papanicolaou 染色が標準法として確立された。標本作製の標準化に関しては本学会でも取り上げられているが²⁾、その背景には特に検査企業に依頼された検体で細胞の保存状態不良や固定不良により診断困難なケースがあること、さらに標本作製方法が施設間、技術者間で統一されていないため、観察者側のクライテリアが定まらないなどの

Fundamental study for the development of automatic fixation apparatus of cytologic smear preparation — First report On usefulness of membrane filter method—

Kanae SAKUMA^{1,2)}, C.T., J.S.C., Yoshio SHIINA²⁾, Ph.D., C.T., C.F.I.A.C., Junko IJIMA²⁾, M.Hs., C.T., C.M.I.A.C., Mitsuki OHKODO³⁾, M.Hs., C.T., I.A.C., Kyohei TADA⁴⁾, M. T.

¹⁾Department of Pathology, Shonan Kamakura General Hospital

²⁾Department of Cytology, ³⁾Department of Pathology, Kyorin University School of Health Sciences

⁴⁾Department of Cyto-Pathology, Kohtoh Biken Medical Center, Chiba Laboratory

論文別刷請求先 〒192-8508 東京都八王子市宮下町 476 杏林大学保健学部細胞診断学教室 椎名義雄

平成 11 年 4 月 28 日受付

平成 11 年 9 月 3 日受理

問題があるように思われる。そこでわれわれは、固定標本作製の自動化を目指し、メンブレンフィルター法を採用したタイホー工業社製の FIL CUP Super (以後 FS) の有用性について検討した。

II. 材料および方法

研究材料は江東微生物研究所千葉病理細胞診研究所に提出された自然尿 78 例、および湘南鎌倉総合病院で採取された穿刺吸引材料 100 例を用いた。穿刺吸引材料の内訳は乳腺 53 例、甲状腺 47 例である。

今回用いたメンブレンフィルター法はタイホー工業社製の FIL CUP Super で、その構造は Photo. 1 に示すように検体を投入するフィルカップ (ロート部分)、フィルターを支えるフィルター枠およびそれを装着するベース部分から成っている。FS 標本は、尿および穿刺吸引検体の細胞浮遊液をロート部分に投入し、注射器で吸引濾過することにより作製した。

Photo. 1 The outside appearance of FIL CUP Super (FS) composed of a frame (3) for supporting the membrane filter, a funnel (1) and the base (2) for installment of the above-mentioned parts

被検尿は 3 等分し、Papanicolaou (以後 Pap.) 標本、Giemsa 標本、FS 標本を作製した。Pap. および Giemsa 標本用は 1,500 回転で 5 分間遠心後、スピッツを倒立させ上清を十分除去し、ピペットで沈渣全量を塗抹し、Pap. 標本は 95% エタノール湿固定、Giemsa 標本は素早くドライヤー冷風にて乾燥した。FS 標本は検体をフィルカップに投入後、緩やかに吸引し、吸引後は速やかにカセットを外し、95% エタノール湿固定を行った。なお、今回の検討には 10 μ m 孔径のメンブレンフィルターを使用した。

穿刺吸引材料は直接塗抹 Pap. 標本と FS 標本を作製した。FS 標本は直接塗抹後、直ちに穿刺針およびシリンジ内を生理的食塩水で洗浄、その細胞浮遊液をフィルカップ内に投入し、緩やかに吸引した後 95% エタノールで湿固定した。

尿検体は先ず直接塗抹標本で Table 1 に示すごとくその性状および保存状態を観察した。次に、直接塗抹標本または FS 標本のいずれかに疑陽性以上の異型細胞が出現した症例について、おのおのの標本中に出現した異型細胞数および細胞診断成績を比較した。

穿刺吸引材料は直接塗抹標本および FS 標本上に対象となる上皮性細胞が塗抹されているか否かについて観察し、同時に FS 法の利点と問題点について検討した。

III. 結 果

自然尿 78 例において、尿検体として適正と思われたものが 51 例 65.4%、不良と思われたのは 27 例 34.6% であった。後者の内訳は細菌や真菌などの微生物の増殖が著明なもの 2 例 2.6%、細胞変性著明なもの 4 例 5.1% (Photo. 2)、細胞量過少 15 例 19.2%、および結晶成分や炎症性細胞が多く観察し難

Table 1 Features of urine that were sent to a commercial laboratory by clinicians

(n=78)

Suitable material	51	65.4%
Unsuitable material	27	34.6%
Marked microbe proliferation	2	2.6%
Marked cellular degeneration	4	5.1%
Excess crystalline component	2	2.6%
Excess cellular component	0	0%
Reduced of cellular component	15	19.2%
Marked bloody urine	1	1.3%
Excess of polymorphonuclear leukocytes	3	3.8%

Photo. 2 Urine material without fixative that was sent to a commercial laboratory from clinicians. Marked cellular degeneration was observed in the nuclei and cytoplasm of malignant cells (Direct method, Papanicolaou stain, $\times 40$)

Photo. 3 Only small numbers of atypical cells with increasing N/C ratio and chromatin were observed in urine specimens prepared by the FIL CUP Super (FS) method (Papanicolaou stain, $\times 40$)

Table 2 Comparison between FIL CUP Super and direct smear method for cytologic diagnosis and number of atypical cells in abnormal urine

Cases	Cytol. diagnosis	Direct smear method		Cytol. diagnosis	Number of atypical cells FIL CUP Super
		Pap.	Giemsa		
1	V	158(19)	304(30)	V	404(59)
2	III b	10(1)	13(3)	III b	18(8)
3	III b	18(3)	25(5)	V	41(9)
4	I	0	0	III	4(0)

() shows number of cell clusters composed of more than five atypical cells

Table 3 Appearance of epithelial cells on smear preparations obtained by fine needle aspiration

		Appearance of epithelial cells			
Direct smeared Pap. preparation		+	+	-	-
FIL CUP Super Pap. preparation		+	-	+	-
Breast	n=53	34 (64.2%)	5 (9.4%)	3 (5.7%)	11 (20.7%)
Thyroid	n=47	34 (72.4%)	5 (10.6%)	1 (2.1%)	7 (14.9%)

いものがおのおの2例2.6%, 3例3.8%, 赤血球過多で観察し難いものが1例1.3%であった (Table 1).

直接塗抹標本またはFS標本のいずれかに疑陽性以上の異型細胞が出現したのは4例5.1%であり, 異型細胞が両標本にみられたのは3例3.6%, FS標本のみ出現したのが1例1.3% (Photo. 3) であった. 標本上の異型細胞数は孤立性および集塊形成型ともにいずれの症例においてもFS標本で最も多く, 次いでGiemsa標本であり, Pap.標本ではFS標本の半数以

下に減少した (Table 2).

穿刺吸引材料では, Table 3に示すごとく, 対象となる上皮性細胞が両標本上に塗抹されていたのは乳腺材料では53例中34例64.2%, 直接塗抹標本にのみ出現したのは5例9.4%, FS標本にのみ観察されたのは3例5.7%であり, 両標本ともに対象細胞が塗抹されなかったのは11例20.7%であった.

甲状腺材料では47例中34例72.4%が両標本上に対象細胞を認め, 直接塗抹標本のみが5例10.6%,

Photo. 4 Cytological findings obtained from a patient with a thyroid tumor by fine needle aspiration. (a) The detailed morphological features of follicular cells are obscured by many erythrocytes. (Direct method, Papanicolaou stain, $\times 10$) (b) Clear background after filtration of many erythrocytes (FS method, Papanicolaou stain, $\times 20$)

FS 標本のみが 1 例 2.1% であり、両標本ともに対象細胞が塗抹されなかったのは 7 例 14.9% であった。

その他の所見として、FS 標本は遠心操作が不要なため固定までの時間が短縮された。穿刺吸引材料は生理的食塩水に洗い出すため、血球成分が濾過され背景が綺麗で観察しやすい標本となり (Photo. 4 a, b)、固定前乾燥も防止された。さらにフィルター上の細胞は均一に塗抹された。その反面、乳腺の粘液癌では粘稠度が高く吸引困難であった。細胞質の一部がフィルター孔に陥没し、その部位が濃染傾向を示した (Photo. 5)。また封入においては、細胞量が豊富な標本では時間経過に伴い気泡が出現したり、フィルターが波打って観察時に焦点を合わせ難いことがあった。染色標本の退色については、細胞量が少ない標本で早い傾向にあった。フィルター孔は特に弱拡大で観察す

Photo. 5 Cellular subsidence into the hole of the membrane filter by aspiration was observed in the cytoplasm and nucleus (FS method, Papanicolaou stain, $\times 40$)

る際に違和感を感じたが、慣れによりある程度解消された。また、スライドガラスの下にスーパーファインシートを敷くことで、若干の光量不足はあるものの通常の観察のみならず写真撮影においても大きな問題はなかった。

IV. 考 察

FS 法は遠心操作を必要とせず、装備が小型軽量で運搬が容易なため、検体を採取する場所で処理できることが最大の利点である。さらに、操作は細胞浮遊液を注射器で吸引するだけであり、現場の医師や看護婦でも容易に取り扱い可能と思われる。とはいえ、器具の装着、吸引、固定、その後の清掃など、現場においては煩雑感もあり³⁾、さらに現状では多数検体への対応はなされていない。したがってわれわれは、採取された細胞の洗浄および湿固定を完全自動化することが標準法としての条件と考え、今回は FS 標本作製における有効性と問題点を明らかにする目的で本研究に取り組んだ。

固定標本作製において考慮すべきことは、細胞変性の防止、集細胞 (細胞捕捉性)、均一な塗抹があげられる。

細胞変性に関しては、採取から塗抹標本作製までの時間経過が最大の要因となる。したがって、検体を検査企業に搬送する場合が問題であり、本来蓄痰を目的に開発された Saccomanno 液⁴⁾などの固定剤や保存液が開発・市販されている^{5,6)}。細胞をより新鮮な状態で固定するこれらの方法は標準法の一角を担うもので

あるが、FSは採取後ただちに固定標本作製することが可能であり、細胞変性を防ぐ点においては標準法の条件は備えている。しかし、畠山ら⁷⁾が指摘しているように、穿刺吸引材料を生食中に洗い出すことで細胞形態が変化する可能性を考慮する必要がある。種々の方法で採取された細胞を生食中で洗浄する試みは坂井ら⁸⁾が穿刺吸引材料で、熊谷ら⁹⁾が子宮内膜擦過材料で行っている。畠山らは上皮系細胞を対象とした場合にその影響は少なく、熊谷らも冷蔵庫で48時間保存しても検鏡に支障をきたすほどの細胞変性はなかったと述べている。今回の穿刺材料は採取後ただちに処理したため診断に及ぼす影響はほとんどみられなかったが、穿刺吸引材料ではリンパ腫も対象になるため、畠山らの報告も無視できない。今後経時的影響やSaccomanno液などの固定液中での洗浄を考慮する必要もあるように思われた。

細胞の捕捉性については小幡ら¹⁰⁾、朝隈ら¹¹⁾の報告にもあるように、Pap.およびGiemsa標本に比べより多くの細胞が塗抹された。この原因として、直接塗抹法はスピッツおよびピペット内に細胞が付着残存すること、すべての沈渣を1枚のスライドグラスに塗抹することが困難なこと、さらにPap.標本は湿固定時の細胞剥離を考慮しなければならない点があげられる。FSはスピッツとフィルカップ内を検体濾過後、または同時に洗浄することが可能なため、より高率に細胞を捕捉できることはいうまでもない。今回は濾過後ただちにカセットを外し、通常の方法で固定液に浸漬したが、濾過終了時点でフィルカップ内に固定液を投入することが可能であり、細胞剥離性はさらに改善されるものと思われる。また今回、穿刺吸引材料の検索でFS標本にのみ細胞が塗抹された症例があり、細胞過少例では穿刺器具に細胞が残存することが確認された¹²⁾。このような場合穿刺器具を洗浄し、遠心してその沈渣を塗抹しても、前述の理由で必ずしも目的の細胞が得られるとは限らない。細胞過少例についてはオートスミア法などの細胞収集法はあるものの、装備の点や操作性を考えるとFS法に勝るとは思えない^{13,14)}。また看護婦や担当医が適正な固定操作を行えるか否かについては、これまでの経緯をみても疑問が残る点である。ことに穿刺吸引材料は慣れた技師でも固定前乾燥を防ぐことは容易なことではなく、したがって固定操作の完全自動化の意義はきわめて重要であると思われる。

スクリーニングにおいて観察しやすい標本を得るた

めには、適正な細胞量をいかに塗抹するかが重要になる。直接塗抹法では固定前乾燥を防ぐために時間的な制約があり、均等に塗抹することができないことがあるが、FS標本は塗抹面が均一で背景の綺麗な標本が得られた。また、細胞がフィルター面に捕捉されるに伴って、吸引圧は上昇し、逆に濾過流量は減少する。したがって、塗抹細胞量は吸引圧または流量との関係の変化を捉えることで調整が可能と思われる³⁾。さらに採取時に混入した血球成分によって目的の細胞が観察しがたいことがしばしばあるが、FSではこれらの問題点はすべて改善されるのが特徴である。しかしながら、壊死物質、血球成分、粘液成分の存在が診断にきわめて有効な所見になる場合があるため、本法を導入するにあたってはこの点を十分考慮しなければならない。その対策として、今回の検索ではフィルター孔径10 μ mを使用した³⁾が、今後それ以下の孔径についても検討する必要がある¹⁵⁾、さらに対象臓器特有な性状（たとえば乳腺における粘液癌のような）を整理し、マニュアル化することも必要と思われた。

これらの有意点に対し、吸引困難例に対する対応、吸引圧による細胞の陥没防止、適正な塗抹量の決定、フィルター孔の問題、標本背景の所見、生理的食塩水での洗浄による細胞の膨化¹²⁾、塗抹処理による細胞像の違い、染色標本の退色防止、コスト高、などが今後の課題として残った。

まず、粘液などで濾過が困難な例は前述の固定液または保存液を加え搬送するのも対策であるが、粘液融解剤の導入を検討する必要があるように思われる。

吸引圧が強い場合、細胞がフィルター孔に陥没し特に核内にこの現象がみられると診断に影響を及ぼすことが考えられた。今回は緩やかな吸引を心掛けたため、そのような症例はきわめて少なかったが、自動化に向けて吸引圧または濾過流量を一定で安定した条件を見出す基礎的実験が必要になると思われる。それに平行して均一な塗抹のための適正な細胞量も決定されることが予想される。観察時のフィルター孔の違和感 は前述のとおり大きな問題とはならないが¹⁶⁾、標準法にするためには光学系の工夫が望まれる。

FSを標準法として位置づけるためには、単に標本作製標準化だけではなく、細胞形態学的所見の再検討も必要になる。この方法で標本作製すると、形態学的所見は直接塗抹法（すり合わせ法や圧挫法ではない）に近いものと思われる。標本作製標準化は細胞診の精度を高める上で重要であるが、観察する側が混乱

しないためにも、この方法に適応したクライテリアの設定が必要になると思われる。

以上述べたように、いくつかの改善点があるものの、FSは固定標本作製において考慮しなくてはならないすべての項目において他の方法に勝っており、完全自動固定標本作製装置への導入において有効な方法であると思われる。

本論文の要旨は第37回日本臨床細胞学会秋期大会（1998年11月、仙台）において発表した。

Abstract

Objective : This study aimed to develop an automatic fixation apparatus for making cytologic preparations.

Study Design : A total of 78 samples of urine and 100 samples of fine needle aspiration material were simultaneously examined by the FIL CUP Super (FS) applied membrane filter method and by a general method, and compared on the basis of preservative condition, collection of cellular materials, and other features.

Results : Overall, FS preparations were better than those made using the general method in the main important characteristics. However, there were several problems with FS preparations including difficulty with mucus rich material, cellular subsidence into the hole of membrane filter with aspiration, difficulty determining the suitable cellular amount, disagreeability of the hole of membrane filter in observation, decreased background features and cytomorphological differences by the smear method.

Conclusion : In this study, we confirmed that the FS was a suitable method for making smear preparations, but still had several weak points, and there is room for improvement before the introduction of this automatic fixation apparatus.

文 献

- 矢谷隆一, 坂本穆彦. 細胞診を学ぶ人のために第2版. 東京: 医学書院, 1993: 45~57.
- 仁平博子, 三浦弘守, 馬嶋恵子, 山岸紀美江, 鈴木不二彦, 松本道男・ほか. 標本作製法の標準化—その1—尿の検体処理. 日臨細胞誌 1993; 32: 162.
- 小林孝子, 岡田美恵子, 吉藤彩子, 坂本真紀子. 液状検体におけるメンブレンフィルターの有用性. 日臨細胞広島会報 1994; 15: 54~56.
- Saccomanno, G., Saundere, R. P., Ellis, H., Archer, V. E., Wood, B. G., Beckler, P. A. Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. Acta Cytol. 1963; 7: 305~310.
- Yamazaki, K., Koketsu, H., Tajima, M., Suemasu, K. A New Method of Preparing for Cytodiagnosis of Lung Cancer. Jap. J. Clin. Oncol. 1985; 15: 415~421.
- 石井保吉, 藤井雅彦, 深堀世津子, 佐久間市朗, 萩原勁, 知名吉江・ほか. YM液を用いた都がん式蓄痰処理法の検討—原発性肺癌の症例を中心に—。日臨細胞誌 1987; 26: 77~82.
- 畠山重春, 戸谷恵美子. 穿刺吸引針の洗浄液について. 衛生検査 1982; 31: 1417~1421.
- 坂井義太郎. 細胞診スクリーニングの実際 3. 乳腺. Medical technology 1981; 9: 647~654.
- 熊谷幸江, 奥沢悦子, 十文字文男, 高坂公雄, 方山揚誠, 石井保吉・ほか. 子宮内膜細胞診におけるエンドサイト生食洗い出し法の有用性について. 日臨細胞青森会報 1996; 13: 15~19.
- 小幡博人, 堀内 啓, 佐藤泰広, 佐藤 夜, 鈴木雅信, 浦田謙二・ほか. 新しいメンブレンフィルター (PORETEC[®]) による眼科領域の細胞診. 日眼会誌 1993; 97 (10): 1179~1184.
- 朝隈蓉子, 千野秀教, 野村利之, 船橋信司, 家村和千代, 伊丹真紀子. PORETEC法 (Membrane filter) による液状検体の集細胞法とその細胞像. 日臨細胞東京会報 1992; 10: 28~30.
- 阿倉 薫, 畠中光恵, 花澤 緑, 綾田昌弘, 岡本 茂, 古川順康・ほか. 乳腺穿刺吸引細胞診における注射器洗浄液の検討. 日臨細胞誌 1991; 30: 1037~1042.
- Kobayashi, T., Ueda, M., Yamaki, T., Yakushiji, M. Evaluation of cytocentrifuge apparatus with special reference to the cellular recovery rate. Diagn. Cytopathol. 1992; 8: 420~423.
- Hutchinson, M. L., Isenstein, L. M., Goodman, A., Hurley, A. A., Douglass, K. L., Mui, K. K., et al. Homogeneous Sampling Accounts for the Increased Diagnostic Accuracy Using the ThinPrepTM Processor. ANATOMIC PATHOLOGY. 1994; 101: 214~215.
- 辻下亜紀子, 深沢政勝, 池沢 剛, 鈴木 悦, 中牟田稔. フィルターの孔径の違いによる操作性および集細胞率の検討—特に尿細胞診検体を用いて—. 日臨細胞誌 1997; 36: 458~459.
- Ocklind, G. Optically Eliminating the Visible Outlines of Pores in Intact Polycarbonate (nucleopore) Filter. Acta Cytol. 1987; 31: 946~949.