 原 著

乳腺穿刺細胞診の新たな針洗浄法

——その方法の確立と、他の針洗浄法との比較検討——

昭和大学藤が丘病院 病院病理科¹⁾，長野がん検診センター検査部²⁾，
昭和大学第2病理学教室³⁾

北村 隆司¹⁾ 那須 直美¹⁾ 楯 玄秀¹⁾ 光谷 俊幸¹⁾
土屋 眞一²⁾ 太田 秀一³⁾

目的：今回われわれは生理食塩水（PSS）の持つ高い洗浄効果と高濃度のアルコール固定を組み合わせた新たな穿刺針洗浄法（昭和大学藤が丘病院式針洗浄法：SF 式洗浄法）を考案し、その検討を行った。

方法：摘出手術が施行された乳腺腫瘍 48 例を用いて、SF 式洗浄法に使用する固定液と手技の検討、ならびに SF 式、PSS およびサコマノ液による各種針洗浄法の細胞像の特徴について検討した。

成績：SF 式洗浄法のもっとも適切な手技は、① 穿刺吸引検体の直接塗抹標本作製後 PSS にて注射針内を洗浄、直ちに洗浄液を 10% ポリエチレングリコール加 95% エタノール液に入れ細胞を固定（アルコール最終濃度は 85% 前後に調整）。② ポアフィルター法あるいはサイトスピン法にて集細胞。③ 冷風にて乾燥。④ 95% エタノール再固定。であると思われた。

各種洗浄法の細胞像の特徴は PSS 洗浄法では細胞および核の膨化が著しく、サコマノ液針洗浄法では核クロマチンの淡染化が目立った。これに対して、SF 式針洗浄法では直接塗抹標本とほぼ同様な核の染色性が得られた。

結語：SF 式針洗浄法は手技に特別な技術を要することなく良好な細胞標本が得られることから、直接塗抹標本作製時における必須の補助的標本作製法となり得るものと考えられた。

Key words : Breast—Aspiration cytology—Needle washing—Two step method

I. はじめに

A novel needle-washing method for breast aspiration cytology —Establishment of a novel method and comparison with older procedures—

Takashi KITAMURA¹⁾, C.T., I.A.C., Naomi NASU¹⁾, C.T., I.A.C., Genshu TATE¹⁾, M.D., Toshiyuki MITSUYA¹⁾, M.D., Shin-ichi TSUCHIYA²⁾, M.D., Hidekazu OTA³⁾, M.D.

¹⁾Department of Pathology, Showa University Fujigaoka Hospital

²⁾Division of Pathology, Nagano Cancer Center

³⁾Second Department of Pathology, Showa University School of Medicine

論文別刷請求先 〒227-8501 横浜市青葉区藤が丘 1 の 30
昭和大学藤が丘病院 病院病理科 北村隆司

平成 11 年 10 月 14 日受付

平成 12 年 2 月 18 日受理

乳腺穿刺細胞診における針洗浄法は穿刺吸引検体の直接塗抹標本作製後、注射針内に遺残する細胞の回収を目的とした補助的標本作製法として行われている。本法に用いられる洗浄液としては洗浄効果の高い生理食塩水（PSS）¹⁾や培養液²⁾，あるいは洗浄操作と固定操作を同時に行うサコマノ液³⁾やそれに準じた市販の固定液⁴⁾などが使用されている。しかし、それらの細胞像と直接塗抹標本との隔たりは大きく、とくに PSS による洗浄標本では細胞の膨化，変性が著しい。また、サコマノ液を用いた場合においても本液のアルコール濃度が 50% 程度と低いため、その細胞標本に

も少なからず細胞の不鮮明化が生じてくる。このような理由から針洗浄法は穿刺細胞診が普及した現在でも穿刺標本作製時における必須の補助的標本作製法とはなり得ていない。このため、われわれはPSSの持つ高い洗浄効果と、ポリエチレングリコール(PEG)を添加した高濃度のアルコールによる直接塗抹標本に匹敵する固定作用を組み合わせた新たな穿刺針洗浄法(昭和大藤が丘式針洗浄法:SF式針洗浄法)を考案し、それに用いる固定液および手技的検討,ならびに直接塗抹標本とSF式,PSS,サコマノ液針洗浄法との細胞像の差異について検討したので報告する。

II. 対象および材料

今回の検討では当院にて病理診断を目的として摘出手術が施行された乳腺腫瘍48例を用いた。SF式針洗浄法の検討においてはこれらの症例のうち乳癌5例,乳腺症3例,線維腺腫2例を対象とした。また,直接塗抹標本と各種洗浄法との細胞像の差異についての検討では乳癌25例,乳腺症7例,線維腺腫6例を対象とした。検討材料はそれらの腫瘍の穿刺吸引物,あるいは必要に応じて擦過物を用いた。なお,穿刺吸引に際しては,千葉大1外式ピストルに20mlの注射器,および21ゲージの注射針を装着した穿刺吸引装置を使用した。

III. 方法および結果

1. SF式針洗浄法の検討

SF式針洗浄法では穿刺針にPSSを吸引することにより針内を洗浄し,洗浄液を直ちにPEG加エタノール固定液に入れ,その後ポアフィルター法にて集細胞を行い,乾燥させた後95%エタノールにて再固定することを基本操作とし,その固定液および手技的検討を行った。

1) 固定液の検討

保湿剤の種類と濃度,およびアルコール濃度の違いによる細胞像の差異についての検討を行った。なお,これらの検討では細胞採取後,採取試料をPSSにて洗浄,直ちに洗浄液をPEG加エタノールに入れ60分固定後,ポアフィルター法(タイホー工業フィルカップスーパー)にて集細胞を行い,2分間冷風にて乾燥後,95%エタノールにて再固定(1時間),パパニコロウ染色を施した。また,本法に使用する固定液の

Photo. 1 Cytological features by SF method (scirrhous carcinoma, $\times 20$). Cytological features depended on the kind of PEG. Drying-artifacts were observed when cells were fixed with 10% PEG 4000 in ethanol (a), but not with 10% PEG 1540 (b)

アルコール濃度は,PEGが温度差に関係なく安定した溶解性を示し,かつ洗浄液(PSS)の量に幅を持たせるためアルコール濃度は高いことが望まれる。このため,高濃度アルコールにおける温度差によるPEGの溶解度についても検討を行った。

A) 保湿剤種類の検討

細胞の剝離防止のために用いる保湿剤の検討では,PEG 1000, 1540, 4000のそれぞれを5%と10%の割合で95%エタノールに溶解した固定液を作製して検討を行った。その結果,散在性細胞あるいは細胞重積軽度な集団が主体を占める標本では,今回検討した保湿剤のすべてに良好な細胞像が得られた。しかし,重積高度な細胞集団を認める症例では,10%PEG 1000加95%エタノール,および10%PEG 1540加95%エタノールのみが乾燥所見のみられない良好な細胞像を呈していた(Photo. 1)。

B) 保湿剤濃度の検討

保湿剤の種類の検討で良好な結果が得られたPEG 1000および1540のうち,スライドガラスへの細胞の接着性により優れたPEG 1540を95%エタノールに2%,4%,6%,8%,10%の割合で溶解した固定液を作製して検討した。その結果(Table 1),細胞重積軽度な集団や,散在性細胞が主体を占める標本では,2%PEG加95%エタノールを除く,他のすべての固定液に良好な細胞像が得られた。これに対して,細胞重積の著しい集塊を認める標本では10%PEG加95%エタノールのみに良好な細胞像が得られ,他の

固定液では PEG 濃度が 8%, 6%, 4%, 2% と低下するに従い, 核クロマチンの淡染化を認める細胞や細胞質がオレンジ G 好性を呈する細胞集塊など, 乾燥を示唆する細胞の増加がみられた。

C) アルコール濃度の検討

保湿性濃度の検討でもっとも良好な細胞像が得られた PEG 1540 を 10% の割合に加えた 95%, 93%, 87%, 82%, 77%, 72%, 67%, 62%, 57%, 52% エタノール固定液を作製し, それぞれの固定液での固定時間と細胞像との関係について検討を行った。なお, 本検討では固定液 40 ml に対して針洗浄液 (PSS) 1 ml としたため, 固定液の最終アルコール濃度はそれぞれ 92.6%, 89.6%, 84.9%, 80.0%, 73.2%, 70.2%, 65.3%, 60.5%, 55.6%, 50.7% となる。また, 判定に際しては出現細胞のすべてに核クロマチンの淡染化がみられないものを良好とし, 一部の細胞に認めるものをやや不良, ほぼすべての出現細胞に核クロマチンの淡染化が観察されるものおよび, 一部の細胞に核クロマチンの不染化を認めるもの

を不良とした。その結果 (Table 2), 今回検討したすべての最終アルコール濃度で固定後 10 分から 5 時間まで比較的良好な核染色性が得られた。しかし, 最終アルコール濃度 50.7~80.0% にて固定された細胞の核クロマチンは, 84.9~92.6% で固定された細胞と比して淡染性を示していた。また, アルコール最終濃度 50.7~80.0% で固定された標本は, 1~3 日以上経過すると核クロマチンの不染化がみられた。このような変化はアルコール濃度が低いほど顕著で, さらに細胞量が少なく, かつ細胞が孤立性にみられる症例では高度であり, 細胞量が多いか, おもに細胞が集団を形成して観察される標本では軽度であった。アルコール最終濃度 92.6%, 89.6%, 84.9% の固定液での核クロマチンは, 固定 1 週間後も良好な染色性を示していた (Photo. 2)。しかし, 細胞質はアルコール濃度が高くなるにつれ収縮傾向が強くなり, その染色性も濃染する傾向を認めた。したがって, 良好な核クロマチンの染色性を保ちつつ細胞質の収縮の程度の低い 85.0% 前後が, 本法のもっとも適切なアルコール最終濃度と考えられた。

D) 高濃度アルコールにおける温度差による PEG の溶解度の検討

PEG 1540 を 10% の割合で加えた高濃度 (98%, 97%, 96%, 95%) エタノール固定液を作製し, これらを冷蔵庫に入れて液温度による変化を観察した。その結果, 98% では 9°C で結晶を認め, 7°C にて液全体が混濁した。97% および 96% では 6°C にて少数の結晶が出現し, 5°C にてそれらが多数となり, さらに放

Table 1 Correlation between the concentration of PEG and cytological features

Cytological features	Concentration of PEG (%)				
	2	4	6	8	10
Isolated cells and small clusters	Partially dried	Good	Good	Good	Good
Large clusters	Dried	Dried	Partially dried	Partially dried	Good

Table 2 Correlation between the concentration of PEG and the staining of chromatin

Final ethanol concentration (%)	Fixing time													
	10min	30min	60min	2h	3h	4h	5h	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day
50.7	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
55.6	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
60.5	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
65.3	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
70.2	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
73.2	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
80.0	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
84.9	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
89.6	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
92.6	←	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

— Good - - - Intermediate Poor

Photo. 2 Cytological features by SF method (scirrhous carcinoma, $\times 40$). Aspirated cells were fixed with ethanol at a final concentration of 84.9% for 1 week. Under fixing conditions where the final concentration of ethanol is over 84.5%, chromatin with a reticular and dense pattern, which is characteristic of scirrhous carcinoma, was conserved

Photo. 3 Cytological features by SF method (a : papillary-tubular carcinoma, $\times 100$, b : scirrhous carcinoma, $\times 100$). Washing time with PSS influenced the cytological features. Prominent swelling of cells and bright staining of nuclei were observed after washing for 2 minutes of high cell density preparations (a) and for 40 seconds at low cell density (b)

Photo. 4 Cytological features by SF method (papillary-tubular carcinoma, $\times 100$). Washing time with PSS influenced the cytological features. In the same case, cells were washed for 5 seconds (a) and for 60 seconds (b). Under the conditions of (b), the number of cell clusters were markedly decreased and the number of isolated cells increased

置すると液全体が混濁した。10% PEG 加 95% エタノールではこのような変化はみられず、PEG 1540 は安定した溶解度を示していた。

2) 手技的検討

固定液の検討でもっとも良好な結果が得られた、10% PEG 1540 加 95% エタノール（最終アルコール濃度 85% に設定）を用い、PSS による注射針洗浄時間、および集細胞後の乾燥時間の違いによる細胞像の

変化についての検討を行った。なお、固定時間は 60 分とし、集細胞法はポアフィルター法にて行った。

A) PSS による注射針洗浄時間の検討

PSS による針洗浄時間を 5 秒、10 秒、20 秒、30 秒、40 秒、50 秒、1 分、2 分、3 分、4 分、5 分行い、その細胞像の検討を行った。その結果、核クロマチンの淡染化は細胞量が多いか、細胞が集団として出現する症例では 2 分経過後 (Photo. 3 a) に、細胞量が少ない症例では 40 秒経過後から明らかな核の膨化と核クロマチンの淡染化を認めた (Photo. 3 b)。また、出現細胞の多くが結合性の強い集団として観察される症例 (Photo. 4 a) のなかには、洗浄時間が長くなるにつれ、このような細胞集団は減少し、散在性細胞の増加を認める症例もみられた (Photo. 4 b)。

B) 集細胞後の乾燥時間の検討

集細胞後、冷風にて 1~15 分（1 分間隔）乾燥させた標本 15 枚、および室温にて 1~5 日（1 日間隔）放置した標本 5 枚の計 20 枚を作製し、その細胞像の比較検討をした。その結果、冷風にて 1~15 分乾燥した標本 (Photo. 5 a) での細胞像に著変はみられなかったが、1 日以上室温に放置した標本には著しい細胞乾燥所見が認められた (Photo. 5 b)。したがって、細胞を PEG により、スライドガラスに定着させるために行う乾燥時間は 15 分以内とし、その後は直ちに 95% エタノールにて再固定することが必要と考えられた。

Photo. 5 Cytological features by SF method (papillotubular carcinoma, $\times 20$). Drying time influenced the cytological features. After collecting cells, cells were air-dried for 15 minutes (a) and at room temperature for 1 day (b). In (b), cells were over-dried

Table 4 Characteristics of the PSS-washing method

1. Swelling of cells and nuclei is prominent.
2. Staining of nuclei and cytoplasm is bright.
3. Intracytoplasmic lumens are not obvious in many cases.
4. The adhesiveness of cells in the cluster is weak.

Photo. 6 Comparison of the cytological features obtained by the direct smear method and by the SF method (scirrhous carcinoma, $\times 100$). Staining of nuclei was the same between the SF method (a) and the direct smear method (b), but the cytoplasm had shrunk and stained dark (a). By the SF method, it was easier to observe nuclear features compared with the direct smear method because nuclei of cells fixed by the SF method showed three-dimensionally conserved features

2. 直接塗抹法とSF式, PSS, およびサコマノ液針洗浄法との細胞像の比較検討

採取試料の直接塗抹標本と各種針洗浄法で作製され

Table 3 Characteristics of the SF method

1. The staining pattern of nuclear chromatins is similar between the SF method and the direct smear method when cell are fixed from 10 minutes to 7 days.
2. Cells are slightly shrunken and the staining of cytoplasm is dark.
3. Intracytoplasmic lumens are obvious because the cytoplasm stains dark.
4. The irregular nuclei are easily observed because the nuclei are three-dimensional.
5. The staining of mucin is retained when cells are fixed from 10 minutes to 7 days.

Table 5 Characteristics of the Saccomanno-washing (YM) method

1. Staining of nuclei is bright and inconspicuous compared with the direct smear method. The chromatin is unstained after the long fixation.
2. Cells are slightly shrunken.
3. Intracytoplasmic lumens are relatively obvious.
4. Cell clusters are conserved.
5. Drying artifacts are severe.
6. The staining of mucin is unstable.

た細胞標本を用いて、その細胞像の比較検討をした。おのおのの洗浄方法は、SF式洗浄法では①細胞採取後、それらをPSS 1 mlにて洗浄して直ちに洗浄液を10% PEG 加95% エタノール液 10 mlに入れ、一定時間放置。②ポアフィルター法にて集細胞。③冷風にて2分間乾燥。④95% エタノール再固定。で行った。PSS洗浄法では①細胞採取後、それらをPSSにて洗浄して一定時間放置。②ポアフィルター法にて集細胞。③95% エタノール固定。で行った。サコマノ液洗浄法では①細胞採取後、それらを武藤化学YM液(液状検体用)にて洗浄して一定時間放置。②ポアフィルター法にて集細胞。③冷風にて2分間乾燥。④95% エタノール再固定。で行った。なお、放置時間はそれぞれ10分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間と1日間隔で7日間とした。

各洗浄法の特徴をTable 3～5に示す。SF式針洗浄法での核の染色性はほぼ直接塗抹法と同様であり、さらに乳癌細胞にみられる“いわゆる緊満感のある核”が観察可能であった。くわえて核は立体的で核形不整の観察が容易であった(Photo. 6)。しかし、細胞質は収縮し、直接塗抹法にみられる細胞に比べ集団の核間距離は密であり、孤立細胞ではN/C比が高い細胞として観察された。また、その染色性も濃染傾向を呈し、このため、細胞質内小腺腔を有する腫瘍細胞

Photo. 7 Comparison of the cytological features obtained by the direct smear method and by the SF method (scirrhous carcinoma, $\times 100$). The intracytoplasmic lumen was obvious by the SF method (b), but not by the direct smear method (a)

Photo. 9 Cytological features by the PSS-washing method (mucinous carcinoma, $\times 40$). In the case of mucinous carcinoma, a good nuclear staining pattern was observed even though cells were incubated for 2 days with PSS

では、直接塗抹法でのそれに比べ明瞭なバルーン状構造として観察された (Photo. 7)。なお、核クロマチンの染色性には固定時間の違いによる変化はみられなかったが、細胞質は固定時間の経過とともに若干の収縮および濃染傾向を認めた。また、粘液の染色性には固定時間による差異は認めなかった。

PSS 洗浄法 (Photo. 8) では細胞および核の膨化が著しく、細胞質は放置 10 分後から細胞集団の中心部の細胞を除く、ほぼすべての細胞が淡染性を示していた。このため、直接塗抹標本に細胞質内小腺腔がみられる症例においてもその構造の確認は不可能であった。また、核クロマチンは孤立細胞では 10 分で、集

Photo. 8 Comparison of the cytological features obtained by the direct smear method and by the SF method (scirrhous carcinoma, $\times 40$). The wedge-shaped cell cluster was observed by the direct smear method (a), but by the PSS-washing method this feature was lost. Swelling of cells was obvious and most cells were faintly stained except for the center of the cell cluster by the PSS-washing method

団では 30 分で不明瞭となり、1 時間経過するとほぼすべての細胞が観察不可能となった。さらに直接塗抹標本に特徴的な細胞配列 (線状、鋳形状、クサビ状など) を認める症例でも、本法標本にはこれらの細胞配列はみられず、腫瘍細胞は孤立性あるいは不定形の細胞集団として出現していた。なお、粘液癌例では 2 日間放置後も良好な核の染色性を示す細胞も観察された (Photo. 9)。

サコマノ液洗浄法では細胞の軽度収縮を認め、細胞質内小腺腔は比較的明瞭であった。核クロマチンの染色性は固定 10 分後より 5 時間まで直接法と比して淡染性、不鮮明であり (Photo. 10 a)、固定後 1~3 日経過するとさらに核クロマチンの不染化は顕著となった (Photo. 10 b)。また、本法では立体的細胞集団の出現を多数認め、くわえて細胞重積を認める集塊には乾燥所見が目立った。さらに粘液の染色性にも変化がみられ、固定直後は直接法との差異を認めないが、固定時間の経過とともにそれらはライトグリーン淡染性のすりガラス様物質として観察された。

IV. 考 察

乳腺領域での穿刺細胞診は病変の質的診断には欠くことのできない検査法の 1 つであり、施設によっては最終診断の役割さえ担っている。乳腺穿刺細胞診にお

Photo. 10 Cytological features by the Saccomanno-washing method (scirrhous carcinoma, $\times 40$, same case as Photo. 2). The staining pattern of nuclei was ground glass-like when cells were fixed in Saccomanno solution for 5 hours (a). When fixing time was more than 1 day, the chromatin was not sufficiently stained to be evaluated and the nucleoli were inconspicuous (b)

ける標本作製の基本は穿刺針内の穿刺物を吹き出した後の直接塗抹法であるが、穿刺物が少量しか得られないときや、針基部に穿刺物が入ってしまった場合などの細胞回収法として、穿刺針洗浄法は欠かすことができない標本作製法であるといえる。

穿刺針洗浄法に用いられる洗浄液には洗浄効果の高い PSS¹⁾ や培養液²⁾、あるいは洗浄および固定操作を同時に行うサコモノ液³⁾や、それに準じた市販の固定液⁴⁾などが通常使用されている。なかでも PSS を用いた洗浄法¹⁾は、わが国でも乳腺細胞診にいち早く応用されていた。しかし、本法では細胞の膨化、不鮮明化が著しく⁴⁻⁷⁾、また、細胞間の結合性の低下により細胞集塊の形態の保存性が悪いことも知られている⁷⁾。このため、上記した PSS 洗浄法の欠点の改善を目的として洗浄液に 1.5~2% 前後の高張食塩水⁵⁾、あるいはアルブミン添加緩衝食塩水⁶⁾を用いた方法も報告されているが、その細胞像と直接塗抹法による細胞像には隔たりを認める。さらにサコモノ液を用いた洗浄法での細胞像は PSS 法に比べ優っているものの、少なからずクロマチンの不鮮明化や細胞集団の立体化が認められ、日頃より見慣れていないと診断は難しいとされている⁴⁾。今回われわれが行った PSS 法およびサコモノ液に準じた固定液である YM 液での細胞像の検討においてもこれらと同様な結果が得られ、それらの細胞像から正確な細胞診断は困難を要す

ると思われた。また、われわれの YM 液を用いた洗浄法の検討では、粘液癌での粘液が、時間の経過とともにライトグリーン淡染性のすりガラス状物質として観察されてきた。YM 液⁸⁾は本来、喀痰中の粘液をその成分である粘液溶解剤にて融解することにより、蓄痰検体の標本作製操作の簡便化を目的とした固定液である。このことから、粘液の染色性の変化は YM 液の粘液融解作用によって起こったものと思われる。したがって、粘液の存在そのものが診断のポイントとなる乳腺穿刺細胞診において、他目的の固定液を安易に用いることは好ましくないと考えられる。

PSS やサコモノ液、あるいはそれに準じた洗浄液を使用した針洗浄法は、操作が簡単でワンステップ法で行える簡便な方法である。しかし、このような針洗浄法では前述のごとく、直接塗抹法標本に匹敵する細胞像を得ることは不可能に近い。このため、操作に特別な技術を必要とせず高率良く穿刺針内の洗浄を行い、さらに良好な細胞像を得られる洗浄法として考案した方法が SF 式針洗浄法である。SF 式針洗浄法は PSS による針洗浄と高濃度のアルコールによる固定を短時間に別々に行う二ステップの洗浄法であるが、本法にて良好な細胞像を得るためには、細胞の剥離防止のために用いる保湿剤の種類と濃度や、固定液のアルコール濃度および洗浄液を加えた最終アルコール濃度の設定などのいくつかの問題がある。

検体を直接アルコールにて固定する場合の固定液には、細胞の剥離防止のために PEG などの保湿剤が含まれている。PEG⁹⁾ は酸化エチレンを重合して得られる物質で水に溶け、平均分子量 200~600 のものは液状、1000 以上のものは固体である。また、PEG は平均分子量の違いにより粘度と保湿性が異なり、分子量の小さい PEG は粘度が低く保湿性は高い。これに対して、分子量の大きい PEG は粘度が高く保湿性は低い。今回検討した PEG 1000, 1540, 4000 の粘度 (cst) は、それぞれ 17.2, 28.6, 79.1 と PEG 4000 は PEG 1000 と比べ約 4.6 倍の粘度を持つが、保湿性は PEG 4000 がもっとも低い。したがって、高濃度のアルコールにより固定された細胞を PEG によってスライドガラスに定着させるためには、粘度の高い PEG 4000 がもっとも適しているが、保湿性の低い PEG 4000 では、それらの細胞を定着させるために行う乾燥操作によって細胞の乾燥を招く恐れがある。われわれの検討結果においても PEG 4000 では、重積高度な細胞集団のみられる症例で乾燥を示唆する所見が

認められた。一方、PEG 1000 および 1540 はともに良好な細胞像が得られたが、PEG 1000 は粘度の低いことから細胞が剥離した可能性も捨てきれない。このため、細胞の標本への定着を目的として PEG を使用する場合は、粘度と保湿性のバランスを考慮すると、従来より用いられている PEG 1540 がもっとも適していると考えられる。

一般的に PEG を含む固定液（蓄痰法のサコマノ液など）^{8,10)} に入れる PEG 1540 の割合は 2% 程度である。しかし、今回の穿刺吸引物の検討では、その割合が 2% 程度と低い場合は核クロマチンの不鮮明な染色性（淡いすりガラス状）や、オレンジ G に染色される細胞集団など乾燥を示唆する所見を認めている。したがって、細胞塊や組織片が採取される穿刺細胞診に用いる PEG 加固定液においても、適切な PEG 濃度を設定する必要がある。今回の検討結果からその濃度は 10% がもっとも適切と考えられた。

固定液のアルコール濃度は室温に関係なく安定した PEG の溶解性を示し、かつ洗浄液の量に幅をもたせるためアルコール濃度は高いことが望まれる。われわれの検討では、10% の割合に PEG 1540 を加えた高濃度アルコールのなかでは、95% エタノールがもっとも安定した PEG の溶解性を示していた。また、洗浄液を加えた最終アルコール濃度を決定する場合は核クロマチンの染色性が細胞量の多寡にかかわらず、すべての例で良好であり、かつ細胞質の収縮の少ない濃度であることを考慮する必要がある。すなわち、高濃度のアルコール固定によって良好な核所見を呈しても細胞質の収縮が著しい場合は、N/C 比および核間距離の評価に支障をきたし、その診断において過剰診断を招く恐れがある。今回の検討結果から、その濃度は 85% 前後が適当と考えられ、固定液と洗浄液の量を調節して最終的にこのアルコール濃度となるよう設定することが望ましい。現在、当院では洗浄液（PSS）1 ml に対して、固定液（10% PEG 加 95% エタノール）10 ml の割合で良好な細胞像を得ている。

今回の検討での集細胞法は穿刺針洗浄法を直接塗抹標本作製後、注射針内にみられる少数の細胞の回収を目的とした標本作製法として位置付けたため、もっとも集細胞率が高いと考えられるポアフィルターにて検討を行った。しかし、細胞量が多い場合はサイトスピンを用いた集細胞法も可能であり、本法での集細胞法は必要に応じた方法を選択することが望ましいと思われる。

SF 式針洗浄法は直接塗抹法と比べ、標本作製に際して特別な技術を要しない点は PSS およびサコマノ液洗浄法と同様であるが、その細胞像には明らかな差異を認める。すなわち、SF 式針洗浄法にみる細胞の核クロマチンは他の洗浄法のそれと異なり、直接塗抹標本に認められる細胞とほぼ同様な染色性を示す。また、本法は細胞を高濃度アルコールに直接入れる固定法であるため、固定液中に浮遊する細胞は固定作用によって三次元的収縮を起こす。このような変化は細胞質で顕著であり、その染色性も直接塗抹標本に比べ濃染傾向を示す。したがって、細胞質内小腺腔を認める場合は直接塗抹標本にみられるそれと比べ、より明瞭な構造として観察されてくる。さらに SF 式針洗浄法にて作製された細胞の核は直接塗抹法の核形態（スライドガラスに吹き付けられ扁平化）と異なり立体的で、顕微鏡でみた場合、焦点が深く、核形不整を認める場合は容易にその形態が観察できることも本法の特徴の 1 つである。

SF 式針洗浄法を応用する場合の注意点としては、洗浄細胞が少ない場合（直接塗抹標本が適切に作製された後の針洗浄）と、洗浄細胞が多い場合（注射針基部に穿刺物を認めるときや吹き出しを行わず洗浄する場合）とでは若干異なる。当院でも現在、実際の検体で応用しているが、前者の場合は 1～2 回の吹き出しにより穿刺針内の細胞の多くは回収されており、洗浄液中にみられる細胞はごく少数（孤立性あるいは小集団）で、大型の細胞集団はほとんど認められない。したがって、このような場合は PSS による細胞変性を防ぐ意味においても、洗浄液を直ちに固定液に入れることが望ましい。これに対して後者では大型の細胞集団がみられる可能性があり、洗浄に際しては複数回のポンピングを行い細胞の解離を促す必要がある。また、固定液中に浮遊細胞が多い場合は集細胞後の標本が厚くなり細胞の乾燥を招くことがあるため、複数枚の標本作製する必要がある。

最後に乳腺穿刺細胞診の判定不能率の割合は施設間差が著しく、その原因の 1 つとして穿刺に際して塗抹手技に熟練した細胞検査士がベットサイドに派遣されていないことが挙げられる¹¹⁾。すなわち、細胞検査士は実際に細胞標本を観察しているため、細胞量の多寡により標本作製法を変え塗抹処理を行えるが、細胞標本を観察していない外科医や看護婦にこの判断を望むことには無理がある。しかし、SF 式針洗浄法は PSS の洗浄による細胞の回収法であるため手技に熟練や特

別な技術を要せず、外科医1人で穿刺、固定操作を行っても細胞の乾燥を招くことはなく、塗抹者に細胞検査士を派遣できない施設においても常に良好な細胞標本の作製が可能である。また、穿刺試料の郵送もできるため登録衛生検査所では直接塗抹法に取って変わる標本作製法として用いることも可能である。したがって、本法はこのような施設にみられる標本不良による判定困難例の削減にも一躍を担うものと考えられる。

稿を終えるにあたり、ご協力頂きました武藤化学薬品株式会社武藤 毅氏に感謝いたします。

本論文の要旨は第40回日本臨床細胞学会総会（東京）で発表した。

Abstract

Objective : We have recently developed a new method to wash the needle for aspiration cytology and named this the Showa University Fujigaoka (SF) method for needle-washing.

Study Design : The SF method is based on the combination of the very vigorous washing effect of physiological salt saline (PSS) and the fixation of cells by highly concentrated alcohol.

Results : The procedure to obtain the best results by the SF method is as follows : 1) Prepare the direct smear of the aspirated cells and wash the needle with PSS. Immediately after washing, add this washing solution into 10% (w/v) polyethylene glycol (PEG) in ethanol to fix cells (final concentration of ethanol is approximately 85%). 2) Collect cells by the pore-filter method or the cytospin method. 3) Air-dry. 4) Fix again with 95% alcohol.

A comparison of this new method with the previous methods showed that the cytological characteristics were different between the washing methods.

Cellular and nuclear swelling are prominent by the PSS-washing method and the staining of nuclei is inconspicuous when cells were washed by Saccomanno solution. In contrast to these methods, the novel SF method revealed a good nuclear staining pattern which was similar to that obtained by the direct smear method.

Conclusion : A particular advantage of the SF method is the ease with which it can be performed and the excellent staining of cytologic specimens. Thus, this method in addition to the direct smear provide a powerful diagnostic tool for

routine breast aspiration cytology.

文 献

- 1) 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.
- 2) Wilkinson, E.J., Sehuettke, C.M., Ferrier, C.M., Franzini, D.A., Bland, K.I. Fine needle aspiration of breast masses, an analysis of 276 aspirates. Acta Cytol 1989 ; 33 : 613~619.
- 3) 渡辺達男, 町田智恵, 石井恵子, 土屋眞一, 寺井直樹, 小池綏男・ほか. 穿刺針の洗浄固定保存液による乳腺細胞診. 日臨細胞誌 1998 ; 37 : 378.
- 4) 阿倉 薫, 畠中光恵, 柊澤みどり, 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滌液の検討. 日臨細胞誌 1991 ; 30 : 1037~1042.
- 5) 中原保治, 中原由紀子, 木下晴希, 三村拓朗, 桂 栄孝. 洗浄検体採取に用いる食塩水濃度の検討. 日臨細胞誌 1993 ; 32 : 336.
- 6) 渡辺芳明, 佐藤由美, 泉田佳緒里, 須貝由美子, 宇佐見公一, 西村公栄・ほか. アルブミン添加緩衝食塩水を用いた穿刺吸引細胞診の処理. 日臨細胞誌 1997 ; 36 : 364~368.
- 7) 伊藤隆志, 則松良明, 伊達昌子, 川西功躬. 子宮内膜細胞診における融解固定液（ビメックス）の使用経験. 医学検査 1991 ; 40 : 1155~1159.
- 8) Saccomanno, G., Saunders, R.P., Ellis, H., Archer, V. E., Wood, B.G. Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. Acta Cytol 1963 ; 7 : 305~310.
- 9) 小林康夫, 丹羽富士子, 近藤明人, 小関敏雄, 柴田偉雄. パパニコロウ染色のための液浸乾燥固定法—固定液の作製とその使用法—. 日臨細胞誌 1980 ; 19 : 459~466.
- 10) Yamagishi, K., Koketsu, H., Tajima, M., Suemasu, K. A New Method of Preparing Specimens for Cytodiagnosis of Lung Cancer. Jpn. J. Clin. Oncol. 1985 ; 15 : 415~421.
- 11) 杉中昭典. ポリエチレングリコールの特性と保湿効果. フレグランス ジャーナル臨時増刊号 1986 ; 9 : 125~126.
- 12) 土屋眞一, 丸山雄造, 高橋洋子, 渡辺達男, 小池綏男, 寺井直樹・ほか. 乳腺穿刺細胞診における判定不能症例の検討—特に標本作製の現状とその改善法について—. 日臨細胞誌 1994 ; 33 : 424~429.