〈特集〉 細胞診の自動化—現状と将来— II. 本邦における細胞診自動化の方向性

細胞診自動化に向けた標本作製の標準化

(株)福山臨床検査センター¹⁾, (株)医学生物学研究所²⁾奥原 俊彦¹⁾ 河口 幸博¹⁾ 内藤 雅嗣²⁾ 高橋 正宜²⁾

目的: 婦人科細胞診を自動化するにはまず、標本の標準化が必要不可欠であると考え、採取検体をアルコールベースの固定液に直接採取する Liquid Based Cytology (LBC) の検証を行った。

方法: 従来塗抹をしたのち、採取器具を固定液で洗浄し、細胞をスライドガラスに薄く均一に塗抹する Thin-layer 標本 (CytoRich 標本) の検体とした。特殊なフィルター (Cyring) を通じて細胞を分散させ、密度勾配法を用いて細胞を集約した後 CytoRich 標本を作製し、従来標本との比較検証を行った。

成績: 作製標本の固定状態、塗抹状態はきわめて良好であった。従来法との相関は良好で病原体などの観察も容易であった。検討した症例 242 例で疑陽性以上の症例は 9 症例で、不一致例は認められなかった。その内、扁平上皮癌症例においては従来塗抹標本よりも異型細胞の出現量が多く認められた。

結論: CytoRich 標本を作製することによって標準化された標本作製が可能となった。また、密度勾配法により、炎症細胞や細胞破片などの不要なものが一定量除去され、鏡検しやすい標本が得られ高精度の検査が可能となった。

Key words: Gynecology—Automated cytology—Liquid Based Cytology—AutoCyte PREP—Thin-layer

I. はじめに

婦人科細胞診検査ではスライドガラスに塗抹された細胞を観察するため、塗抹面が均一で、しかもよく細胞の保存された検体を準備することが、検査の必要条件である。塗抹は、従来法では用手法にて行われるた

め、人によって標本の出来にバラツキが生じることが欠点となっている上、採取された細胞のうち約 10% 程度しか塗抹されず残りは採取器具とともに破棄される^{1,2)}のが現状である。破棄されたところのみに異型細胞が認められる症例も考えられる。もし、破棄された箇所にも異型細胞があった場合、塗抹時の原因による偽陰性が発生する。また、用手法で塗抹する際には細胞がプレパラート上で重なったり、乾燥によって変性を起こしたりする可能性があり時には診断困難の原因となったり、さらに染色中に細胞が脱落した場合などは、判定に支障をきたす原因にもなりうる。近年、精度管理の向上や一次スクリーニングを目的とした細胞診自動化機器が開発され臨床への応用が行われつつあり^{3~5)}、この過程においても効率的な画像処理の前提としてスクリーニングや解析に適した細胞診標本が望ましい。われわれは婦人科細胞診標本標準化の

The standard method for the preparation to turn the automated cytology

Toshihiko OKUHARA¹⁾, C.T., I.A.C., Yukihiro KAWAGUCHI¹⁾, M.D., Masatsugu NAITO²⁾, C.T., I.A.C., Masayoshi TAKAHASHI²⁾, M.D.

¹⁾Fukuyama Medical Laboratory CO. LTD.

²⁾Medical & Biomedical Laboratories CO. LTD.

論文別刷請求先 〒720-0831 福山市草戸町 1 の 23 の 21
(株)福山臨床検査センター 奥原俊彦

平成 12 年 10 月 30 日受付

平成 13 年 1 月 19 日受理

試みとして Thin-layer 標本作製用自動塗抹染色装置 AutoCyte PREP (TriPath Imaging Inc., U.S.A.) を用い、従来標本との比較検証を行い CytoRich 標本の有用性について報告する。

II. 対象と方法

当センターに依頼されているユーザーの協力を得て通常どおり綿棒にて採取された婦人科材料を、直接塗抹した標本（従来標本）と、塗抹後の採取器具の先端

を固定液（Preservative Fluid；バイアル）にて洗浄し、綿棒の先端を折ってバイアルの中に入れたものを CytoRich 標本の検体とした。

AutoCyte PREP を用いて作製した CytoRich 標本 242 例について「標本の状態」、「再現性」、「従来法との比較」をベースにルーチン標本としての有用性につき検証した。

Fig. 1 に PREP 法の原理を示した。患者より採取された細胞をただちにバイアルに浮遊させることにより、細胞の乾燥、変性を防ぐことができる。特殊なフィ

Fig. 1 Prep thin-layer preparation.

Fig. 2 Prep system cell enrichment. Histogram of number of particles per channel in 200 g $\times$ 2 min. Centrifugation.

Photo. 1 Conventionally prepared cervical smear showing numerous over squamous epithelial cells (Pap. stain $\times 10$).

Photo. 2 CytoRich prepared cervical thin-layer showing uniformly distributed squamous epithelial cells (Pap. stain $\times 10$).

ルターである Cyringe に検体を通過させることにより検体中に含まれている粘液を切り、大きな細胞集塊をある程度の大きさに分解する。次に分離剤 (Density Gradient Reagent) を用いることによって診断上有用な細胞を効率的に集めている。この密度勾配法を用いての方法は PREP 法の特徴的な方法で分離剤に検体を重曹したのち遠心分離 (200 G, 2 分間) することによって液層が 3 層に分離する。各液層の構成成分を細胞の大きさで分析すると上層部 2/3 には上皮性成分はほとんど含まれておらず上部 2/3 を取り除くことによって血液成分や細胞の破片などを約 40~50% 削減し、上皮性成分の割合を増加させることが可能である (Fig. 2)。細胞はスライドガラスの荷電差を利用して均一に直径 13 mm に塗抹、染色される。したがって、目的とする細胞を確実にかつ均一に塗抹することができ、さらに一枚ずつ染色を行う手法を用いているため、コンタミネーションが皆無となる。

III. 結 果

細胞の固定はきわめて良好で、従来標本と比較して細胞の重なりは少なく、分布状態も良好で均一な標本が得られた (Photo. 1, 2)。特に従来標本においてしばしばみられる固定不良がなかったことは特筆すべきで、多数の施設検体を取り扱う検査センターなどにおいては、塗抹固定の過程が精度管理上もっとも克服困難な問題を解決することができた。また、多くの赤血球も保存液中で溶血分解していた。腺上皮細胞集塊は、炎症背景のため観察が困難なことがあるが、

CytoRich 標本では余分の炎症細胞が除去され明瞭に認められた。特に老人性炎症患者の検体では従来法だと背景の炎症性細胞に上皮細胞が埋まり判定が困難なことがあったが、CytoRich 標本では炎症細胞は炎症性背景と確認できる程度に減少し上皮細胞の変化が明瞭に観察できた。しかしながら、一部の細胞集塊では立体感のある集塊として出現したものも認められた。また、異型細胞を含む検体から最大 4 枚まで同一標本作製したところすべての標本に異型細胞が認められた。

今回検討した 242 例中、従来標本と CytoRich 標本との相関は良好で今回の検討で、不一致例は認められなかった (Table 1)。陰性症例 233 例のうちカンジダ 5 症例 (Photo. 3)、トリコモナス 1 症例 (Photo. 4)、修復細胞 2 症例を認めたが、いずれの症例も CytoRich 標本で確認することができた。病原体は細胞の固まりが少ないので従来標本よりむしろ容易に同定できた。疑陽性以上の症例は 9 例で Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) 5 症例、High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) 3 症例、Cancer (CA) 1 症例であった。CA は扁平上皮癌症例で、従来標本よりも CytoRich 標本の方が異型細胞の出現量は多かった (Photo. 5, 6)。

以上のことから、AutoCyte PREP によって作製された CytoRich 標本は従来法に比べて細胞の変性が少なく、塗抹が均一で有効な細胞が効率的に集められている上、コンタミネーションが全くない標本作製することが可能であった。また、鏡検範囲も直径 13 mm と限定されているため、診断精度を落とすことな

Table 1 Manual evaluation of CytoRich vs. matched conventional smears

CytoRich smears	Conventional smears				
	WNL	LSIL	HSIL	CA	Total
WNL	233				233
LSIL		5			5
HSIL			3		3
CA				1	1
Total	233	5	3	1	242

WNL : within normal limits

LSIL : low-grade squamous intraepithelial lesion

HSIL : high-grade squamous intraepithelial lesion

CA : cancer

Photo. 4 CytoRich prepared cervical thin-layer with *Candida albicans* (Pap. stain $\times 40$). **Photo. 6** CytoRich prepared cervical thin-layer demonstrating squamous cell carcinoma (Pap. stain $\times 40$). **Photo. 3** CytoRich prepared cervical thin-layer with *Trichomonas vaginalis* (Pap. stain $\times 40$). **Photo. 5** Conventionally prepared cervical smear demonstrating squamous cell carcinoma (Pap. stain $\times 40$).

IV. 考 察

細胞診検査は約 70 年前 Papanicolau によって確立された方法を基本的に現在も踏襲して行われている。今日までに多くの技術革新が行われてきたが、CytoRich 標本作製は Papanicolau 以来の従来の細胞塗抹、固定法に根本的な改定が加わることになる。

現在の細胞診業務において発生しうる偽陰性は「採取時」、「塗抹（標本作製）時」、「鏡検時」に大別されると考えられる。現行の精度管理では「鏡検時」に注力しているが、「採取時」、「塗抹（標本作製）時」における管理はほとんど行われていない。「採取時」、「塗抹（標本作製）時」、「鏡検時」の 3 つの管理が行われて初めて患者の立場にたった精度の高い検査が可能になるのではなかろうか。元来、標本作製の大前提

く鏡検時間を短縮することが可能であった。

は「できるだけ多くの細胞を塗抹」し、より多くの細胞を鏡検すれば検査精度が向上すると考えられている(検査担当者の安心感)が、従来法では患者より採取された細胞の10~20%程度しかスライドガラスに塗抹されることはない上、塗抹方法も個人差があり標準化されているとはいえない。しかも、その細胞群は採取された細胞の全体を正しく反映しておらず偏りが生じていることも報告されている²⁾。AutoCyte PREPを用いることにより液状で検体の採取、保存が可能となり、かつ患者から採取されて細胞のほとんどすべてを回収することが可能である。均一にした液状検体からその一部を採取、塗抹することによって全体つまり患者の状態を正しく反映した標本作製することができる。また、バイアル中に保存されている細胞は約1年保存可能であることが報告⁶⁾されており標本の再作製や各種検討用に使用可能である。

今回の検討において、採取器具は日本でもっとも多く使用されている綿棒を使用した。もともと従来標本においても綿棒採取では「採取量」、「適切な部位よりの採取」「検体の乾燥変性」などの問題点が指摘されている。LBCでは固定液を綿棒が吸ってしまい、綿棒を洗っただけでは細胞の絶対数が少ないものも認められた。ゆえに綿棒のLBCへの適応が難しいと考えていたが、綿棒をそのまま折ってバイアルに入れたままにした検体から標本作成することにより十分な細胞量を得ることができた。検討結果より、綿棒の対応は可能であると考えられるが、従来より問題のある採取器具を使用するよりも、Cervex-Brushなどを使用した方がよいことはいうまでもない。採取方法の標準化も望まれる。

今回、われわれの検討では従来法との不一致例は認められなかったが、Geyerら^{8,9)}や高橋、内藤ら^{10~12)}の報告によると若干の不一致例が報告されている。注目すべきは従来標本陰性、CytoRich標本疑陽性以上の症例である。これは先に述べた患者から採取された細胞を標本上に正しく反映されなかったことに起因すると考えられる。逆に従来標本疑陽性、CytoRich標本陰性の症例も報告されている。原因は従来法の塗抹をした残りをAutoCyte PREP用の検体としたためで厳密な意味での同一母集団での比較とはいえない。この問題を解決した論文がVassilakosら¹³⁾によって1999年に発表された。患者群を従来法のみ(88569人)とPREP法のみ(111358人)に分けて疫学的に調査を行った研究が発表された。検討方法と

しては従来法のみ(群)では通常通りの方法で塗抹固定を行った後パピニコウ染色を行い、鏡検して診断をしたものとし、PREP法のみ(群)では患者より検体採取後従来塗抹をせずに直ちにバイアルの中に採取器具ごと入れたものを検体としてPREP法にて標本作製を行ったのち鏡検をして診断したものとした。それによるとAtypical squamous cells of undetermined significance/Atypical glands of undetermined significanceにおいては従来標本に対してCytoRich標本は43.38%の改善が有意に認められた($p>0.001$)。このことは細胞変性やアーチファクトが減少し鏡検に適した標本が作製できたことを意味する。LSILの例においては従来標本では1.58% (1397/88569)の検出率であったが、CytoRich標本では2.25% (284/111358)と59.49%の改善が有意に認められた($p<0.001$)。また、HSIL以上の症例に関しては従来標本では0.38% (340/88569)の検出率であったのに対しCytoRich標本では0.68% (760/111358)と78.95%の改善が有意に認められた。以上の結果よりCytoRich標本においては従来標本よりも診断精度の高い高品質な標本作製することが可能となった。今回の症例には子宮頸部腺癌症例は認められなかったが、沓沢らの報告⁶⁾によると頸部腺癌においても良好な結果が得られていることが報告されている。

また、1検体から複数枚標本作製してもすべてが同等の標本作製することが可能であったことから免疫組織化学や遺伝子検査への対応も可能となってくる上、婦人科以外の検体に対しても応用が可能であることが報告^{14,15)}されており今後の塗抹の標準化、精度向上に寄与することが期待できる。さらに、テレサイトロジーへの応用が解像力の低下が少なく観察が容易となり有効であるとの報告¹⁶⁾もなされている。

しかしながら、液状採取検体を用いることでのデメリットもある。標本作成の手間が若干増大すること¹⁷⁾や、標本作成費用の増加、また細胞の見方が従来法に比べ若干異なり多少の「慣れ」が必要と思われる。

現在、CytoRich標本を自動スキャニング装置AutoPap 3000 (TriPath Imaging Inc., U.S.A.)で分析することが試みられており、将来的には細胞診検査は標準化された標本作製から自動スクリーニングに至るまでの一貫した自動化ラインが構築されることであろう。

Abstract

Purpose : Standardized preparation is desirable in cytology, due to the use of different devices. The remains problem how clinically diagnostic cells represented on smears because this is the major cause of false negative results. Liquid-based sampling using whole specimens may solve this problem. We confirmed the accuracy of thin-layer preparation from liquid-based sampling.

Method : Immediately after making a conventional smear, the device was rinsed in preservative fluid and dispersed cells pushed through the filter (Cyring). Clinically diagnosable cells were concentrated by a density gradient. After sedimentation, samples redispersed in saline were placed on an automated thin layering machine (AutoCyte PREP). Conventional and thin-layer smears were compared for sensitivity and specificity.

Results : Cell debris and degenerative inflammatory cells were markedly reduced and cells stained well. Microorganisms remained. Nine cases of low-grade squamous intraepithelial lesions were detected from 242 cases using both methods. Cancer cells and dysplastic cells were more concentrated in squamous cell carcinomas.

Conclusion : Thin-layer preparation improved clinical diagnosis. The swift scanning of thin-layer smears on 13 mm circles ensure sensitivity and reliability.

文 献

- Hutchinson, M., Patten, F.W., Stelzer, G.T., Hurley, A.A., Zahniser, D.J., Douglass, K.L. Study of cell loss in the conventional Papanicolaou smear. *Acta Cytol.* 1992 ; 36 : 577.
- 手塚文明, 秀城浩司, 及川洋恵, 鈴鹿 邁, 伊藤圭子, 東岩井久. 子宮頸部から擦過採取される細胞数とスライド標本に塗抹される細胞数. *日臨細胞誌* 1994 ; 33 : 463 ~ 467.
- Takahashi, M., Kimura, M., Akagi, A., Naito, M. AutoCyte SCREEN Interactive Automated Primary Cytology Screening System. *Acta Cytol.* 1998 ; 42 : 185 ~ 188.
- Bishop, J.W., Kaufman, R.H., Taylor, D.A. Multicenter Comparison of Manual and Automated Screening of AutoCyte Gynecologic Preparation. *Acta Cytol.* 1999 ; 43 : 34 ~ 38.
- Howell, L.P., Belk, T., Agdigos, R., Davis, R. AutoCyte Interactive Screening System. Experience at a University Hospital Cytology Laboratory. *Acta Cytol.* 1999 ; 43 : 58 ~ 64.
- 杳沢 武, 清野邦義, 白川洋三, 田上 稔, 高橋奈穂美, 小葉松洋子・ほか. AutoCyte Prep 標本による子宮頸部腺癌の細胞学的検討. *日臨細胞学会北海道支部会報* 1999 ; 8 : 11 ~ 16.
- 布施恒和, 山村美佳子, 鈴木俊紀, 三浦秀人, 富永真琴. サイトリッチ法を用いた細胞診標本の塗抹法の基礎的検討. *医学検査* 1998 ; 47 : 656.
- Geyer, J.W., Hancock, F., Carrico, C., Kirkpatrick, M. Comparison of monolayers prepared with the Cyto-Rich cytology preparation system to matched conventional smears. *Acta Cytol.* 1992 ; 36 : 586.
- Geyer, J.W., Hancock, F., Carrico, C., Kirkpatrick, M. Preliminary Evaluation of Cyto-Rich : An Improved Automated Cytology Preparation. *Diagn. Cytopathol* 1993 ; 9 : 417 ~ 422.
- Takahashi, M., Naito, M. Application of the Cyto-Rich Monolayer Preparation System for Cervical Cytology. *Acta Cytol.* 1997 ; 41 : 1785 ~ 1789.
- 内藤雅嗣, 古屋梨華, 赤木 聡, 木村光子, 宮下剛彦, 高橋正宜・ほか. 細胞診自動塗抹染色装置 CytoRich の有用性について. *日臨細胞誌* 1995 ; 34 : 283.
- 内藤雅嗣. 細胞診自動塗抹染色装置の有用性. *細胞* 1999 ; 31 : 419 ~ 422.
- Pierre Vassilakos, Jacques Saurel, Raymond Rondez : Direct-to-vial Use of the AutoCyte Prep Liquid-Based Preparation for Cervical-Vaginal Specimens in Three European Laboratories. : *Acta Cytol.* 1999 ; 43 : 65 ~ 68.
- 木村光子, 内藤雅嗣, 赤木 聡, 高橋正宜, 伊佐正弘. 細胞診自動塗抹染色装置 CytoRich の喀痰への応用について. *日臨細胞誌* 1995 ; 34 : 998.
- 渡辺永二, 内藤雅嗣, 赤木 聡, 木村光子, 高橋正宜, 伊佐正弘. 細胞診自動塗抹染色装置 CytoRich の尿細胞診への応用について. *日臨細胞誌* 1996 ; 35 : 211.
- 布施恒和, 山村美佳子, 布山繁美, 小池喜子. テレサイトロジーにおけるサイトリッチ細胞診標本の有効性の検討. *日臨細胞誌* 1998 ; 37 : 265.
- 奥原俊彦, 引地明子, 太田節子, 小谷さゆり, 田川幾代, 中島真知子・ほか. 細胞診自動塗抹染色装置 CytoRich の検討. *日臨細胞広島県支部会報* 1997 ; 18 : 33 ~ 35.