 原 著

改良 Ultrafast Papanicolaou 染色を用いた甲状腺迅速細胞診

医療法人野口病院研究検査科病理¹⁾, 同 外科²⁾, 大分医科大学病理学講座第一³⁾

丸田 淳子¹⁾ 橋本 信裕¹⁾ 山下 裕人¹⁾ 山下 弘行²⁾

野口 志郎²⁾ 横山 繁生³⁾

目的：迅速で正確な細胞診報告を行うため改良 Ultrafast Papanicolaou 染色（改良染色）を考案し，甲状腺病変の迅速細胞診への適応を検討した。

方法：迅速細胞診施行後病理組織診断の確定した768例（乳頭癌281例，濾胞癌14例，未分化癌2例，髓様癌3例，悪性リンパ腫16例，濾胞腺腫132例，腺腫様甲状腺腫209例，慢性甲状腺炎19例，リンパ節転移77例，非転移リンパ節15例）を対象とした。2枚の穿刺吸引塗抹標本作製し，改良染色とPapanicolaou染色を施行し，それぞれの細胞診判定結果と病理組織診断とを比較した。改良染色はUltrafast Papanicolaou染色の核染色過程を改良して行った。

成績：改良染色標本は，Papanicolaou染色標本に比して，細胞量が多く，細胞集塊が平面的で染色色素の透過性も良く，塗抹が薄いため顕微鏡的観察に適していた。改良染色では染色が2分以内に完了し，核にアーチファクトのない良好な染色標本作製できた。報告までの所要時間は平均6.7分であった。改良染色の感度は90.2%（277/307），特異度は97.5%（318/326）であり，従来のPapanicolaou染色とはほぼ同等であった。

結論：改良 Ultrafast Papanicolaou 染色法は，迅速な臨床診断に対応できる信頼度の高い染色であるといえる。

Key words : Thyroid neoplasm — Fine needle aspiration cytology — Quick diagnosis —
Modified Ultrafast Papanicolaou stain

I. 緒 言

甲状腺における穿刺吸引細胞診は，診療を効率良く行ううえで極めて重要な検査法である。迅速な細胞診の結果報告は，初診時の外来診療における医師と患者の治療方針の話し合いを可能とし，また凍結切片による術中迅速病理診断検査が不可能な場合における術中診断や術式変更等を可能とする。

現在，最も標準的な染色法であるPapanicolaou染色¹⁾の染色過程は約40分を要する。染色を短時間で完了させるために，これまでKline's stain²⁾，Tao's stain³⁾，Ultrafast Papanicolaou stain⁴⁾などが提案されている。このうちUltrafast Papanicolaou染色は，

Quick aspiration cytology for thyroid nodules by the modified Ultrafast Papanicolaou staining

Junko MARUTA¹⁾, C.T., I.A.C., Nobuhiro HASHIMOTO¹⁾, C.T., I.A.C., Hiroto YAMASHITA¹⁾, M.D., Hiroyuki YAMASHITA²⁾, M.D., Shiro NOGUCHI²⁾, M.D., Shigeo YOKOYAMA³⁾, M.D., F.I.A.C.

¹⁾Department of Pathology, ²⁾Department of Surgery, Noguchi Thyroid Clinical and Hospital Foundation

³⁾First Department of Pathology, Oita Medical University

論文別刷請求先 〒874-0932 大分県別府市野口中町6の33 医療法人野口病院研究検査科病理 丸田淳子

平成14年12月9日受付

平成15年2月28日受理

最も短時間で完了する染色法である。しかし、甲状腺材料においては、しばしばアーチファクトにより、乳頭癌の特徴的核所見の一つであるすりガラス状核クロマチンに酷似した核所見を呈する⁵⁾という欠点がある。

今回われわれは、Ultrafast Papanicolaou 染色における核染色を改良し、2分以内で完了する染色法(改良 Ultrafast Papanicolaou 染色, 改良染色)を考案し、甲状腺病変の迅速細胞診への適応を検討したので報告する。

II. 対象および方法

対象は、当院にて2000年7月から2002年10月の間に、迅速細胞診検査の依頼のあった2533件(全甲状腺細胞診検査の24.8%)のうち、手術が施行され病理組織診断の確定した768例(30.3%)である。768例の内訳は、乳頭癌281例、濾胞癌14例、未分化癌2例、髄様癌3例、悪性リンパ腫16例、濾胞腺腫132例、腺腫様甲状腺腫209例、慢性甲状腺炎19例、リンパ節転移77例、非転移リンパ節15例である。

材料採取はすべて超音波ガイド下の穿刺吸引にて行い、2枚の塗抹標本を作製した。塗抹標本はシリンジより直接吹き付け、必要に応じて針先で伸ばして厚さを調節した。改良染色およびPapanicolaou 染色を施行し、それぞれの染色標本にて細胞診の判定を行った。判定は、良性、悪性、材料不備の3つとした。材料不備は、血液や脂肪細胞、またはコロイドのみの吸引標本をした。

Ultrafast Papanicolaou 染色の特性を評価するため、

Table 1 Modified Ultrafast Papanicolaou staining procedure

- 1) Air drying
- 2) 30 seconds in normal saline
- 3) 10 seconds in alcoholic formalin
- 4) 6 slow dips in water
- 5) 30 seconds in Gill-5 Hematoxylin
- 6) 6 slow dips in water
- 7) 3 slow dips in 0.1% hydrochloric acid with 70% alcohol
- 8) 6 slow dips in water
- 9) 3 slow dips in 1% ammonia water
- 10) 6 slow dips in water
- 11) 6 slow dips in 95% alcohol
- 12) 4 slow dips in Richard-Allan Cytostain
- 13) 6 slow dips in 95% alcohol
- 14) 6 slow dips in 100% alcohol
- 15) 10 slow dips in xylene
- 16) Mount and coverslip

予備検討として、乳頭癌18例、濾胞腺腫20例、腺腫様甲状腺腫20例の術中組織断面より捺印標本を作製し、Yang らの方法⁴⁾に従って染色した。

改良染色は、Table 1の行程で行った。Yang らの方法⁴⁾と大部分同様であるが、核染をRichard-Allan Hematoxylin 2ではなくGill-5 Hematoxylinで、その後の分別、色出しを水ではなく塩酸アルコール、アンモニア水で行った。Papanicolaou 染色は原法¹⁾に従って行った。

改良染色およびPapanicolaou 染色標本での細胞診判定結果と病理組織診断とを比較検討した。

III. 結 果

1. 染色および性状

改良染色およびUltrafast Papanicolaou 染色、Papanicolaou 染色のそれぞれの染色性をTable 2に示す。それぞれの染色標本で核や細胞質の染まり方に違いがあるが、染色の特性を理解すれば細胞診判定の妨げにはならなかった。

すりガラス状核クロマチンに酷似したアーチファクトは、Ultrafast Papanicolaou 染色でみられたが、他の2法では認められなかった。核溝は、Ultrafast Papanicolaou 染色において観察されにくいことがあったが、他の2法では差がなかった。核内細胞質封入体は、染色法による差がなかった。

Ultrafast Papanicolaou 染色および改良染色標本では、赤血球が溶血により除外されるため、Papanicolaou 染色標本に比して薄い塗抹が作製された。その結果、細胞が平面的になるために核間距離が狭くなり大小不同性が顕著に現れた。ほとんどの症例で、Ultrafast Papanicolaou 染色および改良染色標本のほうが、Papanicolaou 染色標本に比して多量の上皮細胞を観察できた。

2. 改良染色法での処理時間

改良染色での生理食塩水による水和処理は、時間とともに進行したが、1分を境にして、1分以上の水和は以下の水和と比して細胞学的に差がなかった。また、標本を生理食塩水中に単に浸すより液中で軽く振るほうが、すみやかに溶血が起こり時間も短縮された。塗抹量に応じて溶血が完了するまで30秒～1分間を要したが、ほとんどの標本では30秒で十分であった。水和後のアルコールホルマリン液での固定も標本を10～20秒間軽く振るほうが良好な染色結果が得ら

Table 2 Hue in Modified Ultrafast Papanicolaou stain, Ultrafast Papanicolaou stain, and Papanicolaou stain

	Staining		
	Modified Ultrafast	Ultrafast	Papanicolaou
Nuclear chromatin	Blue Violet (Gill-5 Hematoxylin)	Dark Blue (Richard-Allan Hematoxylin)	Blue-Violet (Gill-5 Hematoxylin)
Nucleoli	Dark Violet (Gill-5 Hematoxylin)	Red (Richard-Allan Hematoxylin)	Dark-Violet (Gill-5 Hematoxylin)
Cytoplasm, keratocyte	Light Orange (Richard-Allan Cytostain)	Light Orange (Richard-Allan Cytostain)	Orange (Orange G)
Cytoplasm, non keratocyte	Gray-Blue-Green (Richard-Allan Cytostain)	Gray-Blue-Green (Richard-Allan Cytostain)	Green (EA)
Hemosiderin	Gold	Gold	Gold
Colloid	Orange	Orange	Orange, Green

Photo. 1 Artifact of nuclear with ground glass appearance in adenomatous goiter with Ultrafast Papanicolaou staining ($\times 40$). **Photo. 2** There were no nuclear artifact in adenomatous goiter with Modified Ultrafast Papanicolaou staining ($\times 40$).

れた。しかし、30秒以上浸すと核が萎縮し不鮮明となった。

改良染色の過程は2分以内に完了した。

3. 予備検討

Ultrafast Papanicolaou 染色標本では、非乳頭癌症例である濾胞腺腫および腺腫様甲状腺腫由来のほぼ全例の上皮細胞の核にアーチファクトによるすりガラス状核クロマチンに酷似した核所見が観察された (Photo. 1)。アーチファクトの出現は標本ごとに異なり、コロイドや血液成分の多い標本や厚い塗抹標本などでは数多くみられた。改良染色標本では前述のアーチファクトは観察されなかった (Photo. 2)。改良染色および Papanicolaou 染色標本ともに核所見の詳細が明瞭であり、乳頭癌でのみすりガラス状核クロマチンを認めた。

4. 感度、特異度

Table 3, 4 に改良染色と Papanicolaou 染色標本に

おける細胞診判定と病理組織診断を示す。改良染色標本における感度は 90.2% (277/307)、特異度は 97.5% (318/326) であった。従来法である Papanicolaou 染色標本における感度は 91.5% (281/307)、特異度は 98.8% (322/326) であった。改良染色標本の感度および特異度は、Papanicolaou 染色標本とほぼ同様に高値であった (それぞれ $P=0.7$ と $P=0.6$, Fisher's exact test)。

5. false negative, false positive の原因

Table 5 に改良染色と Papanicolaou 染色標本における false negative および false positive の原因を示す。両染色標本で認められた false negative と false positive は、サンプリングエラーを除くと濾胞構造を示す腫瘍細胞の症例であり、それらの病理組織診断は濾胞優位型乳頭癌、濾胞型乳頭癌、濾胞癌、濾胞腺腫であった。

False negative の濾胞優位型乳頭癌の細胞診標本で

Table 3 Histologic and cytologic diagnoses with Modified Ultrafast Papanicolaou stain

Histologic	Cytologic		
	Malignancy (n=285)	Benign (n=348)	Inadequate (n=135)
Malignancy (n=393)			
Papillary carcinoma	208	20	53
Follicular carcinoma	3	9	2
Anaplastic carcinoma	2	0	0
Medullary carcinoma	3	0	0
Malignant lymphoma	15	1	0
Metastatic carcinoma, lymph node	46	0	31
Benign (n=375)			
Follicular adenoma	3	111	18
Adenomatous goiter	5	179	25
Chronic thyroiditis	0	19	0
Lymph node without malignancy	0	9	6

Table 4 Histologic and cytologic diagnoses with standard Papanicolaou stain

Histologic	Cytologic		
	Malignancy (n=285)	Benign (n=348)	Inadequate (n=135)
Malignancy (n=393)			
Papillary carcinoma	209	19	53
Follicular carcinoma	5	7	2
Anaplastic carcinoma	2	0	0
Medullary carcinoma	3	0	0
Malignant lymphoma	16	0	0
Metastatic carcinoma, lymph node	46	0	31
Benign (n=375)			
Follicular adenoma	2	112	18
Adenomatous goiter	2	182	25
Chronic thyroiditis	0	19	0
Lymph node without malignancy	0	9	6

Table 5 Causes of false negatives and positives

	Modified Ultrafast Papanicolaou stain (n=38)	Papanicolaou stain (n=30)
False negative		
Lack of malignant appearance	16	13
Sampling error	14	13
False positive		
Overweighting of irregularity of nuclear	5	4
Overweighting of variation in nuclear size	3	0

は、やや多量の小型円形核を有する異型の乏しい濾胞上皮細胞が散在性および小型濾胞構造を示していた。組織標本では、腫瘍のほとんどは濾胞構造を示し、ごくわずかに乳頭構造を認めたが、核所見は非典型例であった。False negative の濾胞型乳頭癌では、異型の乏しい細胞が散在性に出現し細胞量が少なかった。核内細胞質封入体も認めなかった。組織標本では、腫瘍は濾胞構造のみを呈し、すりガラス状核、核溝、核内細胞質封入体を認めた。False negative の濾胞癌で

は、細胞異型のない小濾胞構造を示す濾胞上皮細胞がみられた。組織標本は、小濾胞で構造された腫瘍を覆う線維性被膜に微小浸潤像が認められた高分化型濾胞癌であった。False positive の濾胞腺腫は、著しい核異型、大小不同性を認める濾胞上皮細胞の散在性出現を多数認めたため濾胞癌を疑ったが、組織標本では被膜浸潤、血管侵襲、転移のいずれもなかった。

改良染色標本のみの false positive の原因は、染色導入初期の不慣れによるものであった。

6. 報告時間

改良染色法における材料採取から報告までの所要時間は、平均 6.7 分、最短 4.6 分、最長 8.5 分であった。

IV. 考 察

甲状腺細胞診において核の大小不同、異型、すりガラス状核クロマチン、核溝、核内細胞質封入体などの所見は重要である⁶⁾。乳頭癌でのすりガラス状核クロマチンは、核溝や核内細胞質封入体よりも特異的に認められるため重要な所見⁷⁾とされている。しかし、Ultrafast Papanicolaou 染色標本では、アーチファクトによりすりガラス状核クロマチンに酷似した核所見が観察され、その頻度は Papanicolaou 染色標本に比してより頻繁にみられる⁵⁾。Ultrafast Papanicolaou 染色による核のアーチファクトは、予備検討での濾胞腺腫や腺腫様甲状腺腫などの非乳頭癌症例のほぼ全例にみられ、乳頭癌への誤判定を導きやすかった。核のアーチファクトは、Richard-Allan Hematoxylin 2 の透明感の強い染色特性、水和・固定・染色液の組み合わせ等の原因が考えられた。これを解決するため、核染色を Papanicolaou 染色の Gill-5 Hematoxylin へ、その後の分別、色出しを塩酸アルコール、アンモニア水に変更した。その結果、核は、アーチファクトを認めず、Papanicolaou 染色と同様に詳細な観察が可能となった。乳頭癌のみですりガラス状核クロマチンを認め、核溝の観察も容易となった。

改良染色の過程において、生理食塩水による 5 秒～5 分の水和で細胞学的判定に適した溶血が得られる⁸⁾。水和時間は、血液量に応じて標本ごとに異なったが、1 分以上行っても溶血効果は同様であった。また、塗抹標本を生理食塩水中で軽く振動させることにより溶血が促進されるため、標本の状態を観察しながら 30 秒～1 分以内の時間で水和処理を行うことが重要であると思われる。その後の固定も標本をアルコールホルマリン溶液中で 10～20 秒軽く振ることが重要であると思われる。風乾固定が不十分の場合には水和処理中に上皮細胞が剥離しコンタミネーションを起こす可能性がある。このコンタミネーションを防ぐには、十分な風乾が重要であり、生理食塩水、ホルマリンアルコール溶液の交換を毎回行うほうがよいと思われる。

Ultrafast Papanicolaou 染色では細胞質を Cytostain 液のみで染め、すべての行程を簡素化しているため染色が短時間で完了する。改良染色では、核染色を変更

し、Ultrafast Papanicolaou 染色の手技を取り入れ、水和および固定時間を最も効率的な時間に設定したため、染色に要する時間は 2 分以内となった。染色時間の短縮により、材料採取より平均 6.7 分で細胞診の判定結果を報告している。そのため、材料不備の検体であった場合には、臨床側はただちに再採取を行うなどの対応が可能である。

風乾固定により萎縮した細胞は、生理食塩水による再水和によって元の形態に戻り、観察可能な形態となる⁸⁾。同時に、風乾した細胞の透明性も元に戻すため、核の詳細な観察も可能となる。改良染色標本での若干の不都合な点は、腺腫様甲状腺腫等を示唆する所見である背景のコロイド成分が、水和処理により取り除かれることである。背景のコロイドの存在は、病変が悪性ではなく良性である可能性が高いことを示唆する⁶⁾。しかし、本検討にて、コロイドが取り除かれたことによる false positive 判定の増加はないことが示された。

穿刺吸引材料の Papanicolaou 染色標本では、混入した血液成分と湿固定により、細胞集塊のほとんどが平面的ではなく立体的集塊となる。過剰な血液成分の混入は、染色色素の細胞への浸透を妨げ、また顕微鏡の高倍率レンズでの焦点ズレを起こすため、詳細な細胞形態学的観察が困難な場合がある。一方、改良染色では、風乾固定と溶血処理により、細胞集塊が平面的でかつ染色色素の浸透の良好な標本が作製でき、混入した血液量に左右されることなく細胞構築やその詳細などの形態学的観察が容易である。また、風乾固定と染色処理過程の簡素化は、染色過程での細胞剥離を最小限に留めることができ、Papanicolaou 染色標本に比して多量の細胞集塊が得られる。Papanicolaou Society のガイドライン⁹⁾は、細胞診の判定にあたって、一定数以上の甲状腺濾胞上皮細胞集塊の観察を求めている。したがって、改良染色は、同ガイドラインの要件を満たすうえでも適切な染色方法であると考えられる。

改良染色および Papanicolaou 染色標本にて、いくつかの false negative, false positive が発生した。両染色ともに認められた false negative, false positive では、腫瘍細胞が濾胞構造を示していた。濾胞性腫瘍における良悪の鑑別は、組織切片での被膜浸潤、血管侵襲、転移のいずれかの確認である¹⁰⁾。細胞診では前述の確認は不可能なため、細胞異型を根拠とした判定となる。濾胞癌を疑う、あるいは濾胞癌と判断すべき

細胞学的所見は、良性病変でもしばしば観察される⁶⁾。一方、異型の乏しい悪性病変もある⁶⁾。その結果、濾胞性腫瘍、濾胞構造優位型乳頭癌において false negative または false positive が発生したが、これらは染色法の違いに起因するものではなかった。改良染色のみの false positive は、染色導入初期の不慣れが原因であった。改良染色では、Papanicolaou 染色より細胞が平面的になるために核間距離が狭くなり大小不同性が顕著に現れる。そのため導入初期の腺腫様甲状腺腫症例にて、核間距離の狭さと核の大小不同性の過大評価が false positive に繋がったが、後に改善できた。

改良染色標本における感度は 90.2%、特異度は 97.5% と、従来の Papanicolaou 染色とほぼ同様に高値であった。染色液は、改良染色では Gill-5 Hematoxylin 液、Cystostain 液が、Papanicolaou 染色では Gill-5 Hematoxylin 液、Orange G 液、EA 液が、それぞれ用いられ、核や細胞質の染色性に違いがある。また、固定条件により細胞配列や細胞所見にも違いがある。しかし、それぞれの染色法の特徴を理解すれば、染色法の違いによる細胞診判定への影響がないことが示された。

改良染色では、アーチファクトがなく細胞形態学的観察に適切な標本が 2 分以内に作製できるため、材料採取より 10 分以内の報告が可能である。また、細胞診判定結果は従来の Papanicolaou 染色と同等の高い感度および特異度である。したがって、改良 Ultrafast Papanicolaou 染色法は、迅速な臨床診断に対応できる信頼度の高い染色であるといえる。本検討は甲状腺の迅速細胞診におけるものであるが、細胞核の詳細は普遍的に重要であるため、他臓器病変の細胞学的診断への応用は可能であると考えられる。

Abstract

Objective : We studied the usefulness of Modified Ultrafast Papanicolaou staining in quick, accurate cytologic diagnosis of thyroid disease.

Study Design : Two specimens from each of 768 thyroid aspirations (393 malignant and 375 benign) were prepared using Modified Ultrafast Papanicolaou staining and standard Papanicolaou staining. In our Modified Ultrafast Papanicolaou stain procedure, the specimen was air-dried, rehydrated, and fixed and the nucleus stained with Gill-5 Hematoxylin. With appropriate rinsing and conditioning, the cytoplasm was then stained with

Richard-Allan Cytostain.

Results : The Modified Ultrafast Papanicolaou specimen is more suitable for observing of epithelial cells, thinner, and clearer than the standard Papanicolaou specimen. The sensitivity of cytologic diagnosis in specimens stained by the Modified Ultrafast Papanicolaou method was 90.2% (277/307) and the standard Papanicolaou method 91.5% (281/307), and specificities 97.5% (318/326) and 98.8% (322/326). The Modified Ultrafast Papanicolaou stain has exquisite cytomorphology without artifacts, requires less than 2 minutes to complete staining, and reaches a diagnosis in less than 10 minutes of aspiration.

Conclusion : The Modified Ultrafast Papanicolaou stain is a reliable procedure for quick diagnosis in thyroid aspiration cytology.

文 献

- 1) Papanicolaou, G.N. A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 1942 ; 95 : 432.
- 2) Kline, T.S., Kline, I.K. *Guides to Clinical Aspiration Biopsy : Breast*. New York : Igaku-Shoin, 1989.
- 3) Tao, L.C. *Transabdominal Fine-needle Aspiration Biopsy*. New York : Igaku-Shoin, 1990.
- 4) Yang, G.C., Alvarez, H.I. Ultrafast Papanicolaou stain. An alternative preparation for fine-needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1995 ; 39 : 55~60.
- 5) Lemos, L.B., Baliga, M., Cason, Z. Ultrafast Papanicolaou stain : one year's experience in a fine-needle aspiration service. *Acta Cytol* 1997 ; 41 : 1630~1631.
- 6) Kini, S.R. *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Thyroid*, 2nd ed. New York : Igaku-Shoin, 1996.
- 7) Yang, G.C., Greenebaum, E. Clear nuclei of papillary thyroid carcinoma conspicuous in fine-needle aspiration and intraoperative smears processed by Ultrafast Papanicolaou stain. *Mod Pathol* 1997 ; 10 : 552~555.
- 8) Chan, J.K.C., Kung, I.T.M. Rehydration of air-dried smears with normal saline. Application in fine-needle aspiration cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 1988 ; 89 : 30~34.
- 9) The Papanicolaou Society of Cytopathology, Task Force on Standards of Practice. Guidelines of the Papanicolaou Society of Cytopathology for the examination of fine-needle aspiration. *Diagn Cyto* 1996 ; 15 : 84~89.
- 10) Rosai, J., Carcangiu, M.L., DeLellis, R.A. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the thyroid gland. Third Series*. Washington, D.C. : Armed Forces Institute of Pathology, 1992.