原 著

アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法の有用性についての検討

佐野 順司^{1,4)} 吉本 尚子¹⁾ 溝口 良順²⁾ 齊藤みち子³⁾

東海産業医療団中央病院臨床検査科¹⁾, 藤田保健衛生大学医学部第2病理学²⁾, 堀尾安城病院³⁾,
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科⁴⁾

Key words : Cytological findings—Histological findings—Cell block method—Sodium alginate (SA)

目的: アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法と細胞診所見を併用することにより, 細胞診正診率の向上を目的とした。

対象: 当院の子宮内膜細胞診塗抹後のエンドサイトおよびブラシ洗浄液 495 検体, 穿刺針洗浄液 67 検体, 気管支ブラシ洗浄液 14 検体, 合計 576 検体を用いた。また, マウス白血病培養細胞 L1210 (以下 L1210 と略す) を微量遊離細胞の回収効果実験の対象検体とした。

方法: ①一次遠心後, 洗浄し, 1% アルギン酸ナトリウムを加えた後, 1M 塩化カルシウムを加えて固めた。固形物を通常の方法でパラフィン包埋した。②培養液を希釈して, 全量 5 ml を用いてアルギン酸ナトリウム法および従来のキムワイブ法で標本作製し, HE 標本中 100 μm^2 の細胞数を比較した。

結果: アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法で作製した HE 標本は, 細胞診と同様の所見が得られた。塗抹細胞診の重積性細胞集塊はセルブロックによって組織構造所見が明瞭となり, 免疫染色結果も良好であった。培養細胞希釈実験により, 少数遊離細胞検体を高率に回収できた。

結論: アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法は簡便であり, 細胞診所見と併用することにより細胞診正診率の向上に寄与できると考えた。

I. はじめに

細胞診検査の塗抹標本で, 重積性細胞集塊のある症例では, 十分な染色性が得られないばかりか, 集塊の詳細な観察ができないことがある。細胞集塊の構造を組織像として観察できるセルブロック法を併用することにより, 細胞診の診断を補助すると考え, アルギン酸ナトリウムを用いた方法^{1,2)} (以下 SA 法と略す) で細胞所見と組織構造所見を検討したので報告する。

II. 対 象

2003年1月より2004年2月までの間, 当院臨床検査科に

Utility of sodium alginate cell block method

Junji SANO^{1,4)}, C.T., J.S.C., Naoko YOSHIMOTO¹⁾, C.T., J.S.C.,
Yoshikazu MIZOGUCHI²⁾, M.D., Michiko SAITO³⁾, M.D.

¹⁾Central Hospital of Tokai Medical Institute

²⁾Department of Pathology, Fujita Health University School of Medicine

³⁾Horio Anjo Hospital

⁴⁾Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University

論文別刷請求先 〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁
又 21 愛知医科大学病院病理部 佐野順司

平成 16 年 4 月 19 日受付

平成 17 年 6 月 16 日受理

提出された子宮内膜細胞診塗抹後のエンドサイトおよびブラシ洗浄液495検体, 気管支ブラシ洗浄液14検体, 乳腺穿刺針洗浄液54検体, 甲状腺穿刺針洗浄液10検体, 耳下腺穿刺針洗浄液3検体, 合計576検体を比較検討対象とした。

微量遊離細胞の回収効果実験にはL1210を用いた。

III. 方 法

提出検体を1500 rpm 5分間遠心後, 沈渣を20%ホルマリンで約3時間固定した。1500 rpm 5分間遠心後上清を捨て, 蒸留水で洗浄し1500 rpm 5分間遠心後 (Photo. 1a), 上清を捨て, 1% アルギン酸ナトリウム (和光純薬工業: 190-09991) 0.5 ml を加え, 混和し1500 rpm 5分間遠心後上清を捨てる。これに1M塩化カルシウムを2, 3滴加えると瞬時にゲル化する。ゲルをピンセットでつまんで取り出し (Photo. 1b), ティッシュペーパーの上で固形物に含ま

れる水分を取り, 包埋カセットに収納し, 通常の方法でパラフィン包埋した。深切り切片を含め6~8切片を1枚のスライドガラスに乗せてHE染色した (Fig. 1)。

微量遊離細胞検体の回収効果実験は, L1210の細胞数をコールターカウンターで測定後, 培養液を希釈して, 全量5 ml をサンプルとした。アルギン酸ナトリウム法と従来法のキムワイプ法で, 標本を作製し, HE染色標本中100 μm^2 の細胞数を測定した。

免疫染色は, 一次抗体 Estrogen Receptor (1D5), Progesterone Receptor (1A6) (DAKO) を使用し, ヒストファインシンプルスステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイ) を使用し染色した。

電子顕微鏡観察標本は, ヒト白血病培養細胞 CESS (以下CESSと略す) を2%グルタルアルデヒドで前固定し, 1% オスミウム酸で後固定後, 本法でゲル化した検体をLR White (応研商事) で包埋し作製した。

IV. 結 果

子宮内膜細胞診塗抹後のエンドサイトおよびブラシ洗浄液, 乳腺穿刺針洗浄液, 甲状腺穿刺針洗浄液, 耳下腺穿刺針洗浄液, 気管支ブラシ洗浄液 576 検体すべてセルブロック標本として作製し評価可能であった (Table 1)。

増殖期子宮内膜エンドサイト Papanicolaou 染色 (以下Pap. 染色と略す) 標本では, 重積性の強い細胞集団の辺縁に, 内膜の腺構造と認識できる細胞集塊がみられ, その

Photo. 1 Sodium alginate embedding procedure. a: Samples after secondary centrifugation. b: Precipitate removed after adding 2-3 drops of 1 M CaCl_2 .

Sodium alginate preparation

1. Suspend in DW, 1 g/100 mL.
2. Heat to 70~90°C while mixing.
3. Cool.

Embedding procedure

1. Wash the Endobrush or Endocyte with 20% formaldehyde solution.
2. Centrifuge the washing liquid at 1500 rpm for 5 min. SUP. Discard.
3. Suspend PPT with 2~3 mL of DW.
4. Centrifuge at 1500 rpm for 5 min.
5. Suspend PPT in 1 mL of SA (1% sodium alginate).
6. Centrifuge at 1500 rpm for 5 min.
7. Add 2~3 drops of 1 M CaCl_2 to the PPT.
8. Pick up gel.

3, 4 Can be skipped in actual practice.

DW: distilled water

SUP: supernatant

PPT: precipitate

Fig. 1 SA method protocol

Table 1 Distribution of tissue types in some diagnostic samples examined using the SA method

Tissue type	Number of cases	Positive cases	Suspicious cases	Negative cases
Endometrium	495	6 *	103	386
Bronchus	14	5 **	5	4
Mammary gland	54	14 ***	9	31
Thyroid gland	10	0	4	6
Salivary gland	3	0	2	1
Total number of cases	576	32	123	428

*Endometrial carcinoma, G2 : 4 cases

Endometrial carcinoma, G1 : 1 case

Mucinous adenocarcinoma : 1 case

**Squamous cell carcinoma : 2 cases

Adenocarcinoma : 2 cases

Small cell carcinoma : 1 case

***Scirrhous carcinoma : 6 cases

Solid tubular carcinoma : 5 cases

Papillotubular carcinoma : 2 cases

Mucinous carcinoma : 1 case

中に核分裂像が認められた (Photo. 2a). エンドサイト塗抹後, 器具をホルマリンで洗浄した検体を SA 法で作製したセルブロックの HE 染色標本では, 比較的大型の内臓腺がみられ, その中に Pap. 染色標本で認められた核分裂像が, よりはっきりと確認できた (Photo. 2b).

気管支ブラシ洗浄液 Pap. 染色標本では, 細胞量が少量で, 出血性背景を示す標本中に少数の異型細胞が認められた. 異型細胞は重積性で, 核は N/C 比大で偏在性, クロマチンが増量しており, 粘液空胞と核小体が認められた (Photo. 3a). 気管支ブラシ洗浄液の SA 法セルブロック HE 染色標本では, 核が偏在する小型乳頭状構造, 核の重積性のある腺管状配列をしており, この像は細胞診標本と同一の形態を示した (Photo. 3b).

耳下腺穿刺針洗浄液標本では, 中央に小型リンパ球が集塊状に存在し, 外側にはライトグリーンに染まる立方状細胞が配列し, その直下には不規則な上皮集塊が認められた (Photo. 4a). 耳下腺穿刺針洗浄液の SA 法セルブロック HE 染色標本では, 二相性の核を有する円柱状の上皮と間質のリンパ球より構成される腫瘍で Warthin tumor と診断された (Photo. 4b).

L1210 を段階希釈して, それぞれ細胞数をカウントした結果を Table 2 に示した. 1 μ L 中 40 個の希釈まで高率に回収可能であり, SA 法とキムワイプ法の間で $n=5$ で t 検定を行ったところ危険度 1% で有意差ありの結果を得た. SA 法では, アルギン酸ナトリウムが, 細胞を包み込むように回収しているのが観察された (Photo. 5a). 一方キムワイプ法では, 細胞は回収されなかった (Photo. 5b).

エンドサイト塗抹後, 器具をホルマリンで洗浄した検体

を SA 法で作製したセルブロックの免疫染色標本では, Estrogen Receptor (1D5), Progesterone Receptor (1A6) ともに陽性像を示し, 乳腺穿刺針洗浄液の SA 法セルブロック免疫染色標本では, Estrogen Receptor (1D5) で陽性像, Progesterone Receptor (1A6) で強陽性像を示し, これは組織診の結果と同様の結果が得られた.

電子顕微鏡の培養細胞 CESS 所見では, 微細構造が明確に観察でき, さらにアルギン酸ナトリウムは高電子密度微細顆粒を含む均一な無構造物質として観察された (Photo. 6).

V. 考察・まとめ

セルブロック作製法は, 旧来から遠沈管を用いる方法が知られている. この方法は, 標本作製過程に時間と手間を要するため, 寒天, ゼラチン, 血液凝固因子³⁾, コロソニオンバッグ⁴⁾, ナイロンメッシュ^{5,6)}, クロロホルムを用いる蛋白凝固型固定液法^{7,8)} などを使用する方法が考えられてきた.

アルギン酸ナトリウムは止血剤として治療に使用されているほか, 食品添加物として粘調整剤や人工イクラを作る原料に使用されている. アルギン酸は, マンヌロン酸とグルロン酸の 2 種類の単糖から構成されており (Fig. 2a)⁹⁾, そのナトリウム塩は水溶性でカルシウムイオンの存在下でナトリウムイオンとカルシウムイオンの交換が起こり, アルギン酸はカルシウムイオンを抱き込むような egg box junction 構造を形成しゲル化することから (Fig. 2b)⁹⁾, 微量遊離細胞検体においても, その回収率が他法に比べて高

Photo. 2 a : Cytological findings from an endometrial smear specimen subsequently diagnosed as showing the proliferative phase of the endometrium. The arrow shows a mitotic figure (Papanicolaou stain, $\times 40$). b : Histological findings from the same specimen obtained using the cell block method. The arrow shows a clear mitotic figure (HE stain, $\times 40$).

いと考えられ、特に微量検体においても有用と考えた。少量の検査材料から、微小組織片を含む子宮内膜塗抹後の洗浄液まで、容易に回収が可能である。個々の細胞観察所見は、固定法が組織診と同じであるため、細胞の保持およびHE染色の染色性は同様の結果が得られる。ゼラチンや寒天とは違い加熱を要せず、細胞を固定後、ゲル状に固めるためアーチファクトが少ない。また、本法は血漿を使用せず、血漿成分および抗体が加わらないため、血漿を含む他法と異なり、免疫染色にも安定した結果が得られた。また、電顕にも応用できる。アルギン酸ナトリウムは安価であり、セルブロック作製操作は簡便である。有機溶剤を使用しないため安全でもある。

アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法を通常細

Photo. 3 a : Cytological findings from a bronchial brush smear specimen that were subsequently diagnosed as indicating an adenocarcinoma of the lung (Papanicolaou stain, $\times 100$). b : Histological findings from the same specimen obtained using the cell block method (HE stain, $\times 100$).

胞診標本と併用することにより重積性細胞集塊、微量遊離細胞を含む検体の正診率の向上に寄与できると考察した。

謝辞 こころよく培養細胞、電子顕微鏡写真の提供をしていただきました名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 加藤宏一教授に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第43回日本臨床細胞学会秋期大会（2004年11月、東京）において発表した。

Abstract

Objective : Cytological and histological findings were obtained using the cell block method and sodium alginate (SA).

Photo. 4 a : Cytological findings from a FNA of salivary gland smear specimen subsequently diagnosed as a Warthin tumor of the salivary gland (Papanicolaou stain, ×40). b : Histological findings from the same specimen obtained using the cell block method (HE stain, ×40).

Photo. 5 Comparison of microscopic views of a 40 cells/μL dilution. Sodium alginate method (a) and kimwipe method (b) (HE stain, ×10).

Table 2 Comparison of L1210 cell counts using the SA and kimwipe methods

	SA method *, average	Kimwipe method, average
40 cells/μL	35.1 (Photo. 5a)	L1210 cells not detected ** (Photo. 5b)
80 cells/μL	38.7	13.6
160 cells/μL	51.0	91.0
320 cells/μL	56.4	100.5
640 cells/μL	123.6	109.3

*SA method : sodium alginate method

**L1210 cells : mouse lymphoma cells

Area : 100 μm²

Photo. 6 Ultrastructural findings. Transitional electron microscopic view ($\times 5000$) of a CESS cell (myelomonocytic leukemia). N : nucleus, V : vesicle, MV : micro villi, SA : sodium alginate

*Provided by Dr. Koichi H. Kato, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University.

(G)

(M)

G : L-guluronic acid
M : D-mannuronic acid

Fig. 2a Chemical structures of sodium alginate

Fig. 2b Schematic representation of calcium-ion chelation to poly-L-guluronic sequences.

Study Design : Washing liquid from the Endobrush or Endocyte, the FNA needle, and the bronchial scratch brush was sampled. The SA method and the kimwipe method were then compared.

Results : Samples that exhibited the usual cell clumping when examined using the smear method showed clear histological characteristics when examined using the SA method. Good preparations were obtained using the SA method when the samples had a small number of cells.

Conclusion : Cytological and histological specimens can be simultaneously obtained using the SA method, allowing a more accurate diagnosis.

文 献

- 1) Basch, P.F. An Alginate matrix double-embedding method for paraffin sectioning of minute specimens. *Stain Technology* 1986 ; 61 : 235~238.
- 2) Guo, J.F., Jourdian, G.W., Maccallum, D.K. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989 ; 19 : 277~297.
- 3) 三浦弘守, 森谷卓也, 望月静枝, 笹野公伸. セルブロックの正しいつくり方. *病理と臨床* 2002 ; 20 : 32~39.
- 4) 伊藤 仁, 宮島葉子, 長村義之. セルブロック作製法と病理. *細胞検査への応用. 検査と技術* 2002 ; 30 : 1387~1390.
- 5) 夏目園子, 新福正人, 佐竹立成・ほか. 子宮内膜細胞診におけるセルブロック法の検討. *日臨細胞誌* 1991 ; 30 : 657~661.
- 6) 藪下廣光, 古谷 博, 水野義己・ほか. 子宮体癌のスクリーニングにおける子宮内膜細胞診とセルブロック法併用の有用性. *日臨細胞誌* 1995 ; 34 : 1089~1093.
- 7) 前田勝彦, 笹井久豊, 伊藤真子, 石原明徳. セルブロック作製法 アルコールとクロロホルムを用いて. *日臨細胞誌* 1995 ; 34 : 994.
- 8) 畠山重春, 和泉智子, 倉若志保. 液状検体よりのセルブロック標本の作り方. *Medical Technology* 1999 ; 27 : 613~618.
- 9) 佐藤貴哉, 寺松泰英, 中根俊彦. アルギン酸カルシウム微粒子の開発と化粧品への展開. *繊維学会誌* 1996 ; 52 : 20~26.