

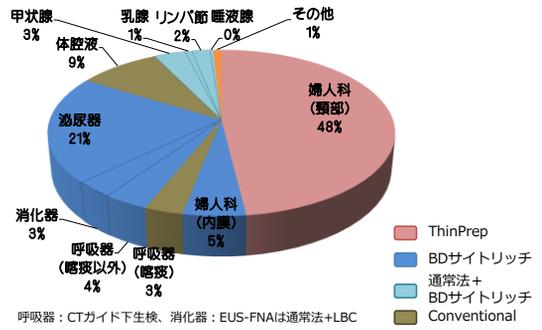
京大病院的LBC活用術



京都大学医学部附属病院検査部（病理部門）
白波瀬浩幸

北海道臨床細胞学会・北海道細胞検査士会 第27回細胞診従事者講習会
2015年3月8日（日）

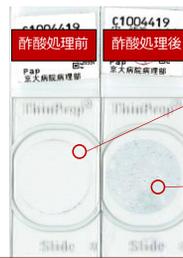
京大病院細胞診検体内訳



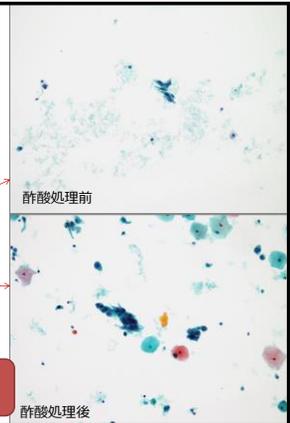
本日の内容

- ThinPrep活用術
 - LBC法のピットフォール
 - p16/Ki-67二重染色
- BDサイトリッチ活用術
 - フィルター転写法と沈降法の形態学的差異
 - EUS-FNAでの応用

血性検体では細胞が少ない！



酢酸処理実施率
272件 / 27,105件 (1.0%)



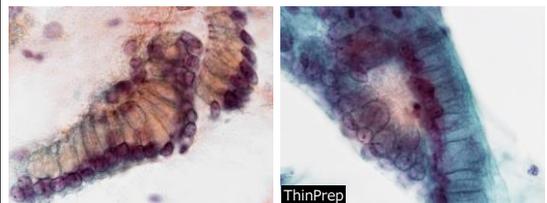
MDAの細胞所見（通常法）

- 極めて高分化な粘液性腺癌
 - 細胞異型が乏しいため誤陰性になりやすい（正常・良性異型腺細胞に類似）
- 特徴的な細胞所見
 1. 粘液性背景（黄色調）
 2. 大型シート状集団，辺縁は柵状配列
 3. 細胞質は高円柱状で黄色調粘液を含む
 4. 核は微細なクロマチン，軽度の大小不同性
 5. （良性に比べ）細胞極性の乱れ，核の大小不同性，核縁が肥厚，核小体の明瞭化が目立つ

※ 1-4 はLEGHでもあてはまる

黄色調粘液の不明瞭化

LEGH症例（スプリット・サンプル）



通常法

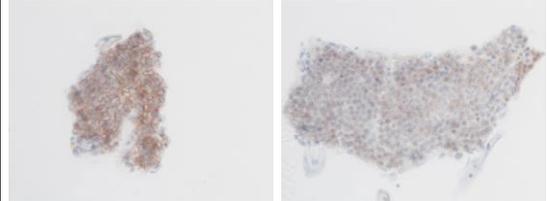
ThinPrep
LBC法

細胞保存液の組成

成分	PreservCyt® Solution	BD シュアパス™ 保存液
メタノール	30-60	1-2
エタノール		18-30
イソプロパノール		1-1.8
水	40-70	66.2-80

濃度 (%)

LBCでは、黄色調粘液は不明瞭であるが、再標本作製して免疫細胞化学染色ができる



HIK1083

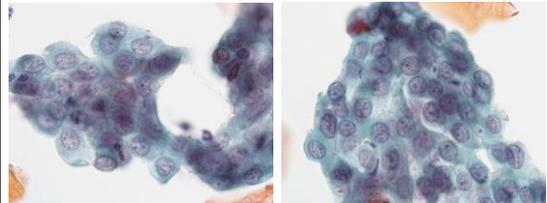
MUC6

LBC法を導入すると

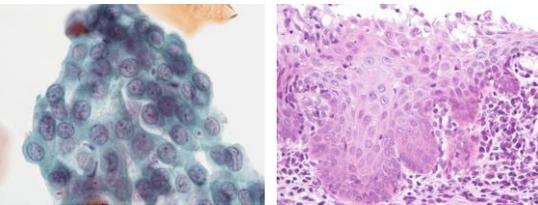
- 適正標本の作製度合
通常法 < LBC法
- 適正標本での細胞判定の容易度
通常法 ✕ LBC法

症例1. ASC-H

40代, 4年前円錐切除(CIN1)フォロー中



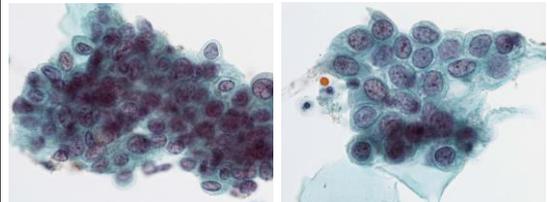
症例1. 未熟扁平上皮化生



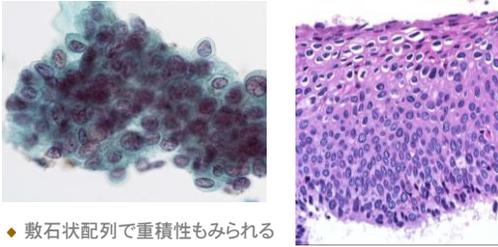
- ◆ 敷石状配列、細胞質は多稜形で、辺縁明瞭
- ◆ 核は概ね円形で、クロマチンは微細顆粒状
- ◆ 核の大小不同性や核形不整は目立たない

症例2. HSIL

20代, 前回 ASC-H

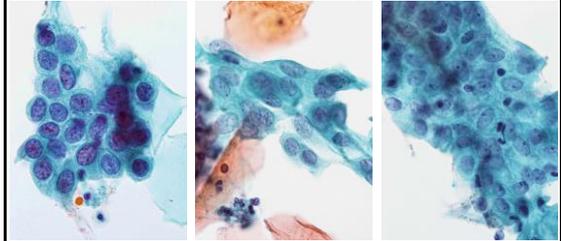


症例2. CIN3



- ◆ 敷石状配列で重積性もみられる
- ◆ N/C 比が高く、核形不整あり
- ◆ クロマチンはやや粗い

ASC-Hと判断されうる病変・変化



CIN3/HSIL

異型未熟化生

萎縮性変化

小括 (ピットフォール)

- 血性検体では細胞数が少なくなる
 - 酢酸処理を行って再標本作製
- 胃型粘液が不明瞭になる
- LBC法を採用したら、細胞判定が容易になる訳ではない
 - 不適正検体は確実に減少する

p16/Ki-67 二重染色 vs HPVテスト

	ASC-US (n=361) 陽性率	CIN2+ (n=77) 感度	CIN2+ 特異度
p16/Ki-67 Dual-Stain	34.9%	92.2%	80.6%
HR-HPV	69.5%	90.9%	36.3%

Schmidt D et al. Cancer Cytopathol 2011;119:158-66.

HPVテスト陽性 (HC2法)

ハイリスクHPVの13タイプ
のいずれかが存在



感染?
腫瘍化?

p16/Ki-67 二重染色陽性

- p16 :細胞周期の調節に関与している Rbタンパクの不活化
- Ki-67 :増殖を休止している G₀ 期でない



腫瘍化

p16/Ki-67二重染色 (京大変法)

<対象>

- 子宮頸部擦過ThinPrep®標本 54例

<検討試薬>

- 一次抗体 (カクテル)
 - p16^{INK4a} (クローン: E6H4、ロシュ・ダイアグノスティックス)
 - Ki-67 (クローン: ab15580、Abcam)
- 二次抗体 (酵素マイクロボリマー試薬)
 - Mach 2 Double Stain 2 (BIOCARE Medical)

<対照試薬>

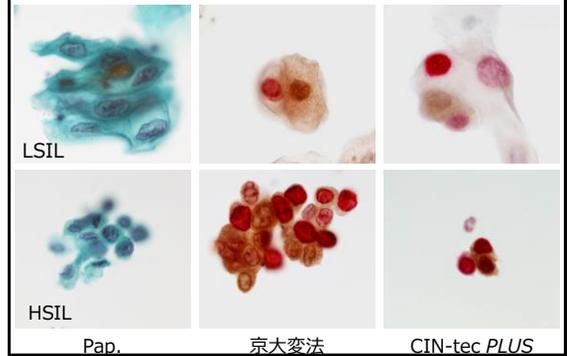
- CINtec Plus Cytology Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス)

p16^{INK4a}クローン: E6H4、Ki-67クローン: 274-11 AC3

症例

細胞診	組織診		
	NILM	CIN1	CIN2+
ASC-US (n=3)	3	0	0
AGC (n=2)	2	0	0
LSIL (n=13)	1	10	2
HSIL (n=29)	1	0	28
SCC (n=4)	0	0	4
AIS (n=2)	0	0	2
Adenocarcinoma (n=1)	0	0	1
合計 (n=54)	7	10	37

染色態度の比較



結果

		CIN-tec PLUS	
		陰性	陽性
京大変法	陰性	14	0
	陽性	0	40

一致率：100%

京大変法の特徴

- 染色ステップが少ない
 - 短時間で染色可能
- Ki-67の局在が明瞭
 - ファーストレッドの滲みがない
- 試薬の汎用性あり
 - 試薬の有効利用ができる
- 試薬購入に時間を要さない
 - CIN-tec plus for cytology KIT は、受注生産のため発注から納入まで4-5週間

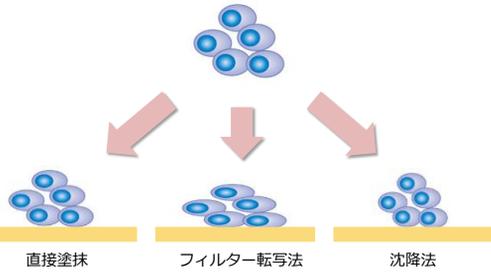
小括 (p16/Ki-67二重染色)

- p16/Ki-67二重染色は、CIN2以上の病変の検出において感度と特異度が高い
 - HPV テストに代わって、ASC-USのトリアージに使える可能性が期待される
 - 高度病変の診断補助ツールとして利用が期待できる
- p16/Ki-67二重染色・京大変法は、市販キットと同等の結果が得られる有用な方法である

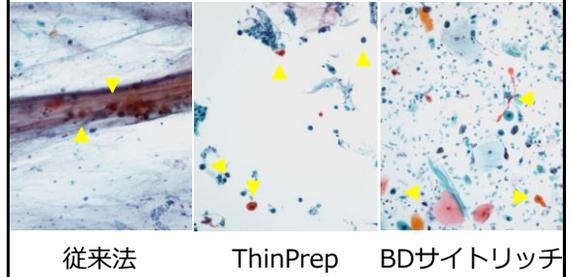
本日の内容

- ThinPrep活用術
 - LBC法のビットフォール
 - p16/Ki-67二重染色
- BDサイトリッチ活用術
 - フィルター転写法と沈降法の形態学的差異
 - EUS-FNAでの応用

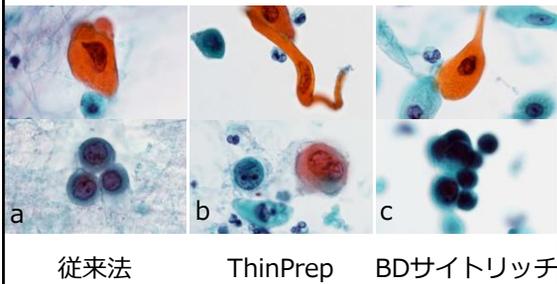
塗抹原理の違いによる細胞形態変化



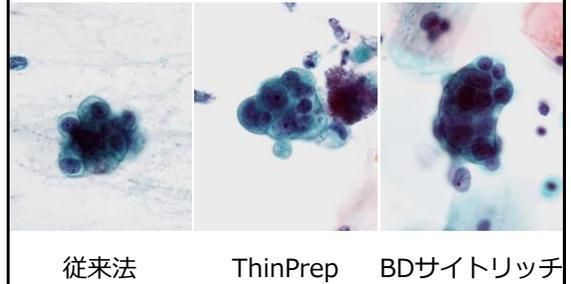
喀痰の弱拡大像



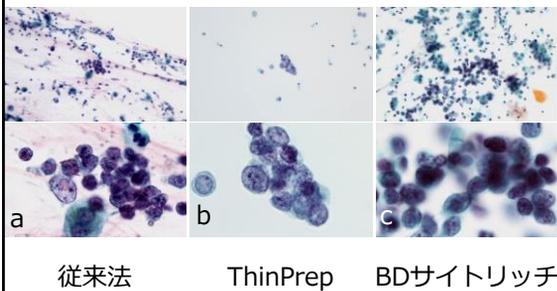
扁平上皮癌



腺癌



小細胞癌



肺癌の細胞像の特徴

- 扁平上皮癌
 - 角化型では各法の差がほとんどみられない
 - 非角化型ではBDサイトリッチ法で核濃染が強調される
- 腺癌
 - ThinPrep法は、クロマチンが淡く、核小体がより目立つ
 - BDサイトリッチ法は、立体的、細胞径収縮の傾向があり、クロマチン増量や核縁肥厚が目立つ
- 小細胞癌
 - LBC法は背景粘液が少なく、核濃染した異型細胞が目立つ
 - 疎な細胞結合性も保持されていることが多い

細胞像の比較

	ThinPrep	BDサイトリッチ
背景（白血球等）	少・不均等分布	多・均等分布
細胞集塊	平坦化	立体的
細胞の大きさ	膨化	収縮
核形不整	明瞭	より明瞭
核膜	薄い	厚い
クロマチン	淡い	濃い
核小体	より明瞭	明瞭

小括

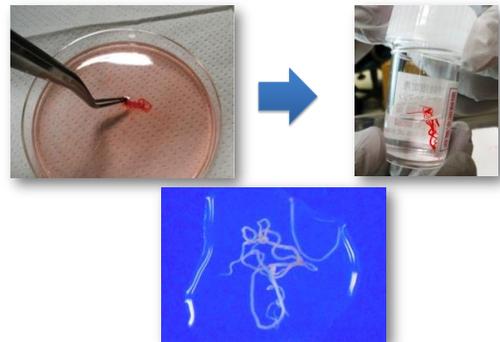
（フィルター転写法と沈降法の形態学的差異）

- フィルター転写法では、細胞・細胞集塊が平坦化、クロマチンが淡くなる、核小体がより目立つ
- 沈降法では、集塊は立体的で、細胞が収縮しクロマチンが濃染、核の立体不整が分かりやすい
- LBCの各法によって染色時間を変更して、各々の最適条件での標本作製が望ましい

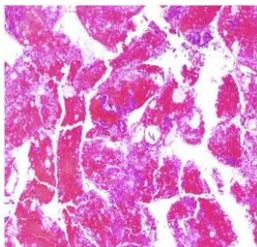
① 細胞診用の検体を採取後、シャーレにサイトリッチレッド™を入れ、溶血を行う



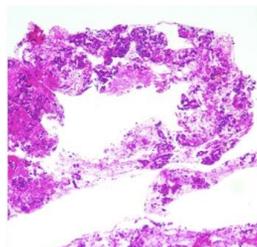
② 有形成分（糸状）を回収し、ホルマリン固定



溶血（-）



溶血（+）



まとめ

- LBC法の導入は、標本作製の標準化、不適正検体の減少、保存検体から分子病理学的検索への応用などの利点がある
- 一方で、コストの問題やピットフォールも存在する
- 直接塗抹法やLBC各法によって、背景所見や形態学的な差異があるため、特徴を知る必要がある