

平成23年度千臨技細胞診検査研究班精度管理報告

液状検体による細胞判定とLBC法を用いた
標本作製の評価

君津中央病院 松尾 真吾

千臨技細胞診検査研究班精度管理委員

目的

千葉県におけるLBCの導入状況とLBCに対する考え方の把握

液状検体における細胞判定の評価

LBC作製標本の細胞数の評価

方法

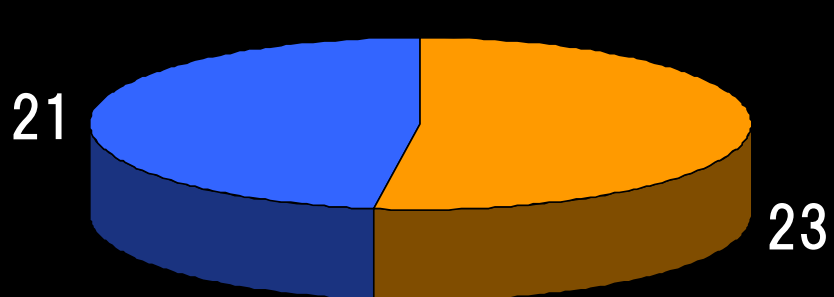
1. 腹水を塗抹、アルコール固定後迅速コーティング剤を塗布した未染色標本①、LBC PREP容器に腹水をサイトコレクト液で固定したもの②を送付
2. 同時に日臨技ホームページに細胞診精度管理調査を掲載
3. 各施設にて①の標本と②を用いて作製したLBC PREP標本をPapanicolaou染色し、それぞれの細胞判定を実施。並びに細胞診精度管理調査を回答
4. 染色標本を回収
5. 精度管理調査の集計、細胞判定の評価、LBC PREP標本作製の評価を行った

1. 細胞診精度管理調査の集計

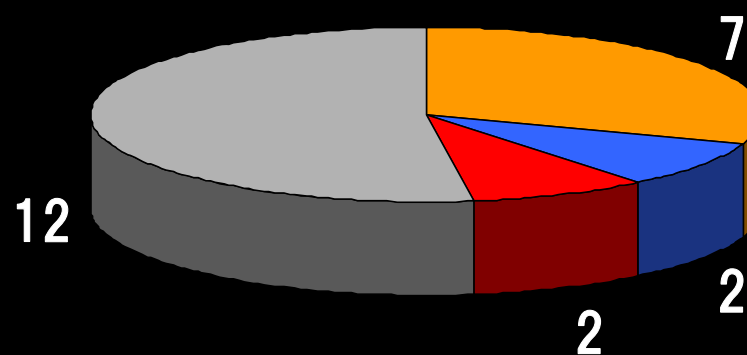
LBCに関する調査

44施設より回答を得る

LBC標本作製の経験の有無とその手法

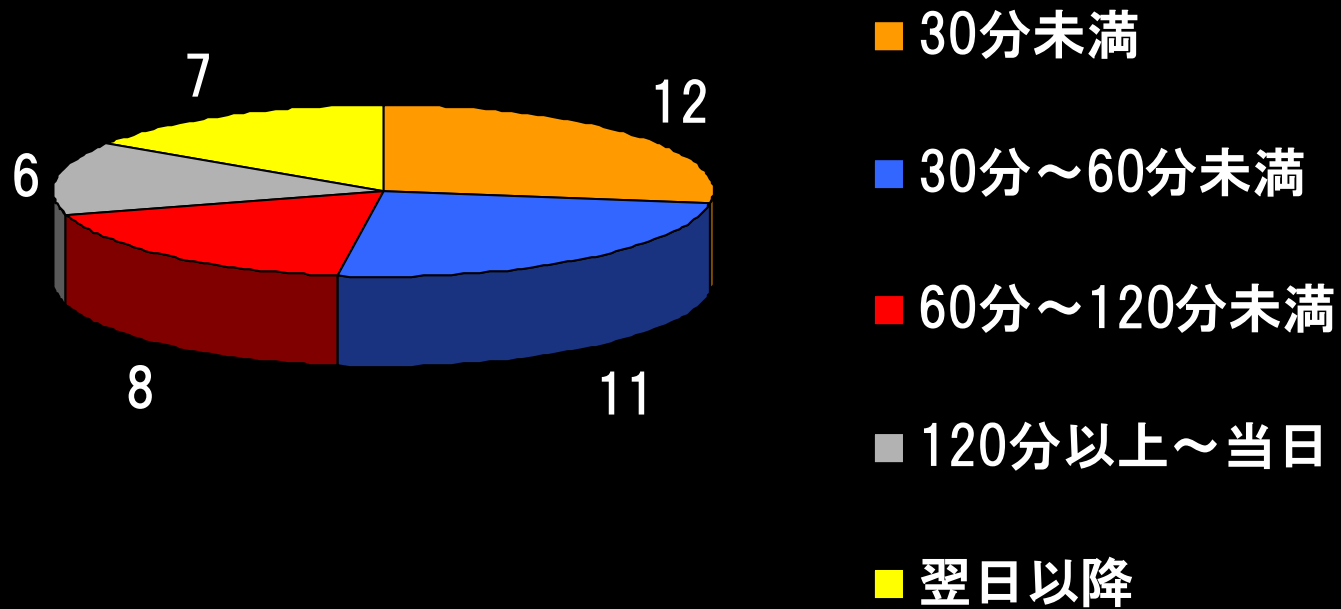


- はじめて
- 経験あり

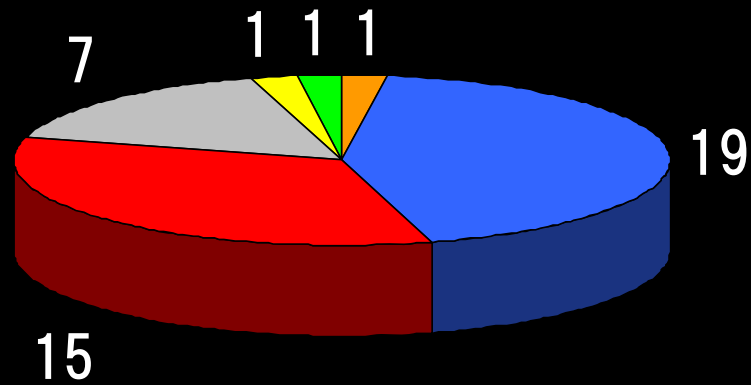


- ThinPrep法
- SurePath法
- TACAS法
- LBC PREP法

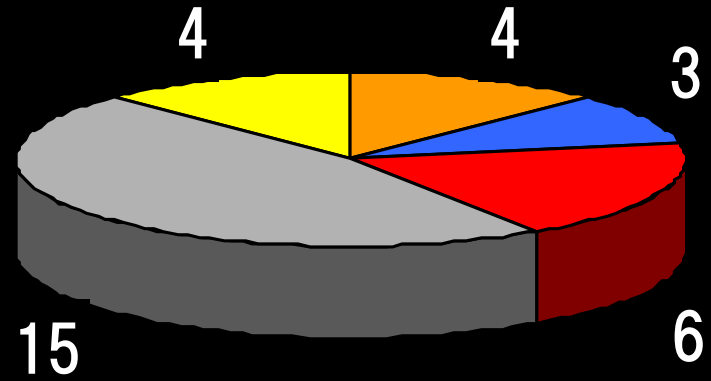
LBC PREP標本塗抹後のアルコール再固定時間



LBC PREP標本作製の煩雑さとその理由

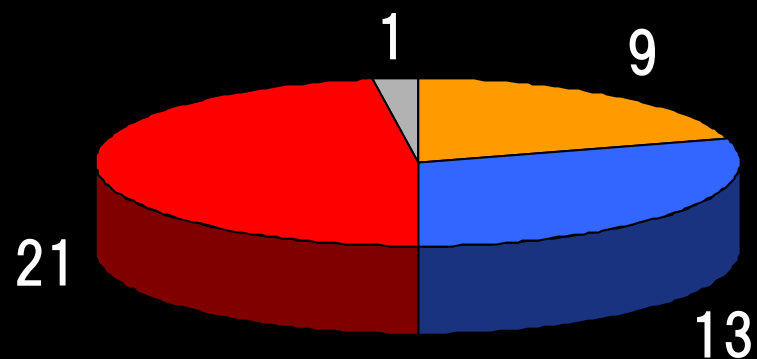


- 簡単
- やや簡単
- やや煩雑
- 煩雑
- 非常に煩雑
- 慣れれば問題ない



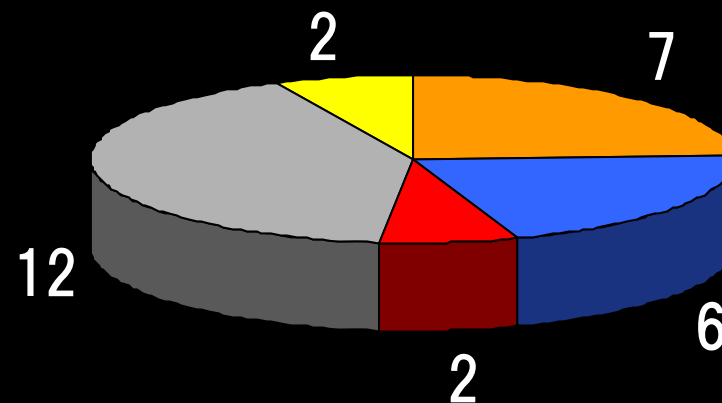
- 遠心
- 上清の廃棄
- 細胞の再浮遊
- スライドグラスセットから固定
- すべての工程

LBCの導入状況



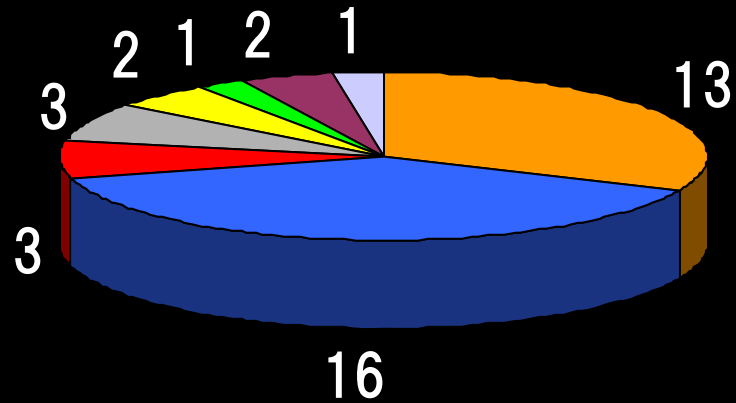
- すでに導入
- 今後導入予定あるいは検討中
- 導入予定なし
- 未定

導入中あるいは検討中の手法



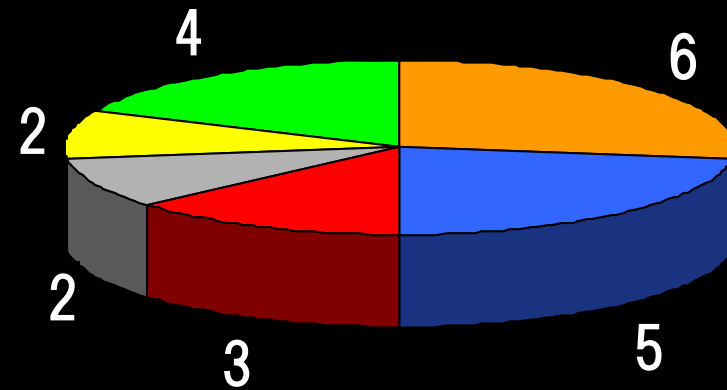
- ThinPrep法
- SurePath法
- TACUS法
- LBC-PREP法
- 未定

LBCを用いたい分野



- 液状検体
- 婦人科
- 乳腺
- 甲状腺
- 消化器、胆汁、胆管ブラシ
- 呼吸器
- 歯科
- リンパ節

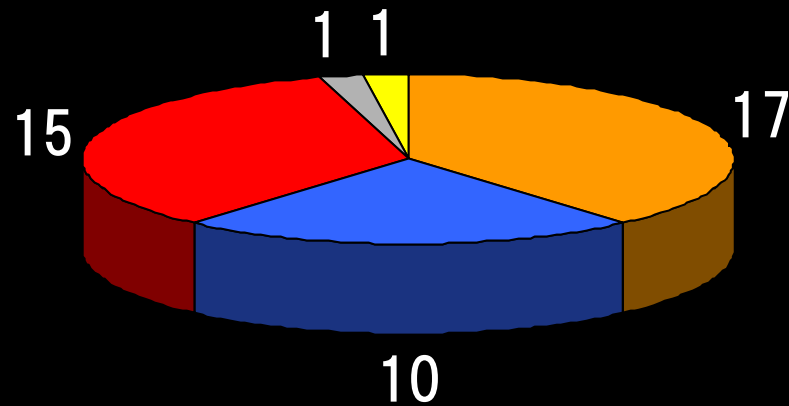
LBC導入検討の理由



- 細胞数の確保
- 検体保存、再作製
- HPV、遺伝子検査、免染、特染への対応
- 鏡検のしやすさ
- 細胞変性、乾燥の防止
- その他

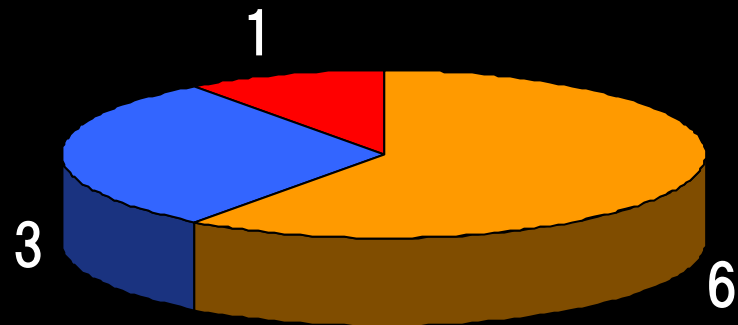
LBC PREPと従来法との比較

鏡検のしやすさ



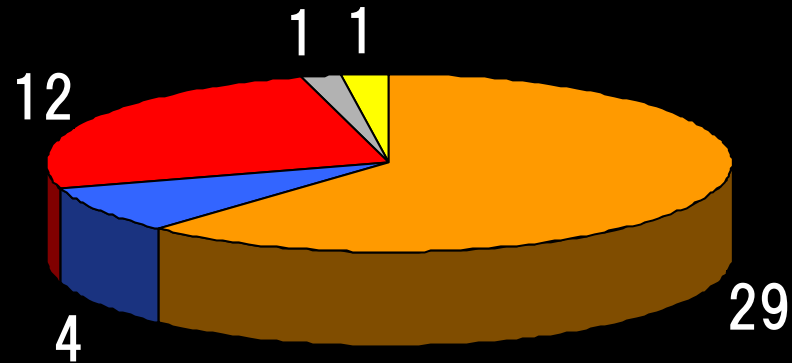
- 鏡検しやすい
- 鏡検しづらい
- 変わらない
- その他
- 未回答

鏡検しづらい理由



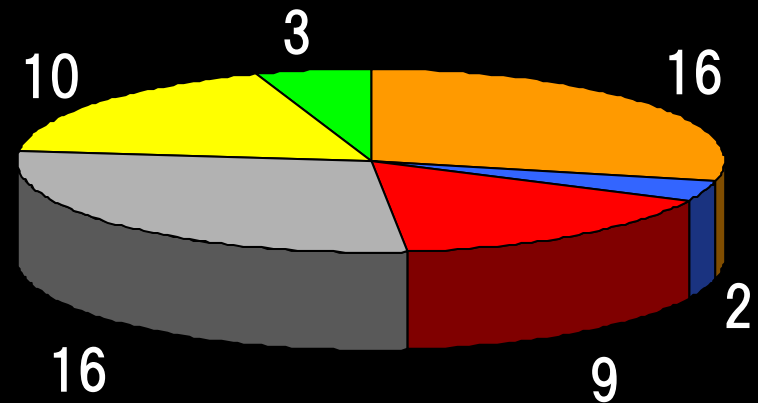
- 細胞の変化、変性
- 重積、密集、ピントが合いづらい等の見え方
- 見慣れない

細胞全体の比較



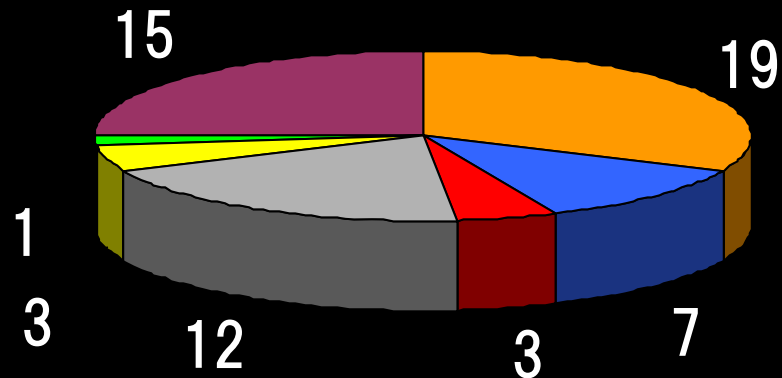
- 収縮傾向が見られる
- 膨化傾向が見られる
- 変わらない
- 立体感がなくなる
- 細胞数が減少する

細胞質の比較



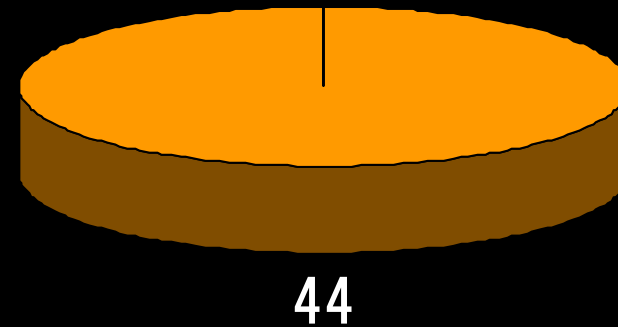
- 丸くなる傾向が見られる
- 不透明感が見られる
- 重厚感が見られる
- 収縮傾向が見られる
- 変わらない
- その他
- 膨化傾向が見られる

核の比較



- 濃縮傾向が見られる
- 濃染傾向が見られる
- 淡染傾向が見られる
- 核内構造が明瞭である
- 核内構造が不明瞭である
- クロマチンパターンに違いが見られる
- 変わらない

塗抹の状態について



- 均一に塗抹された

2. 細胞判定評価

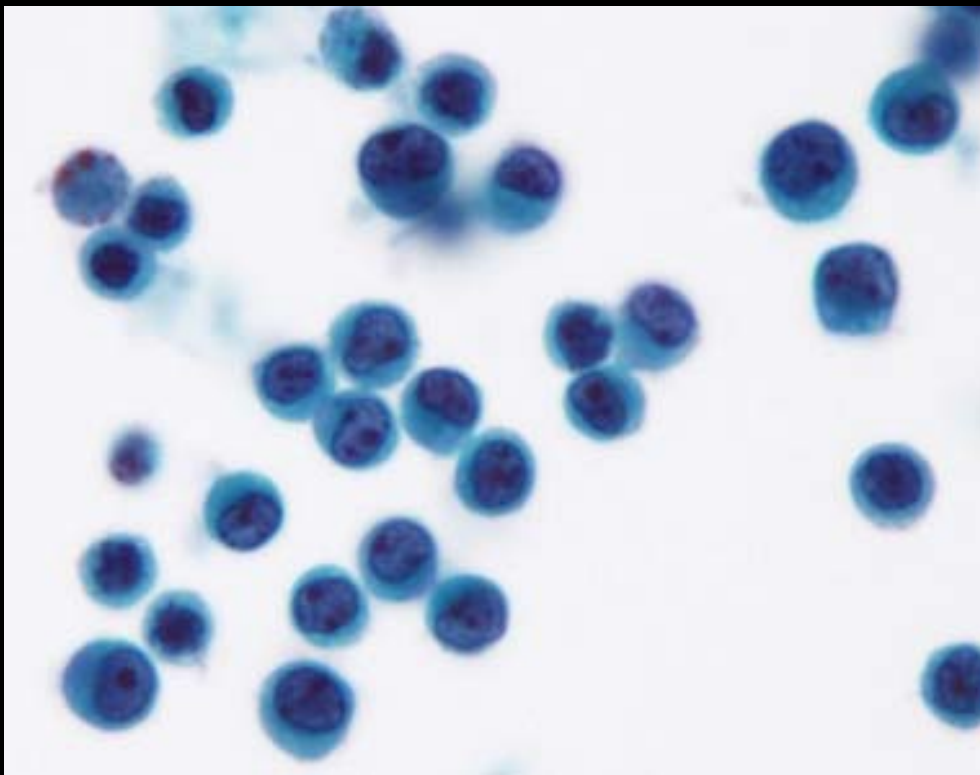
44施設の集計

症例

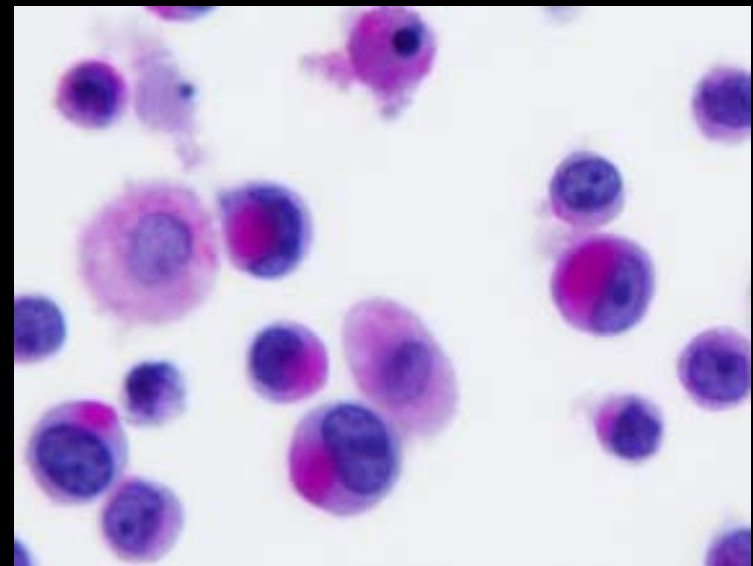
60代 女性 腹水

胃癌術後3年。胸腹水貯留により精査

細胞判定 腺癌



Papanicolaou染色

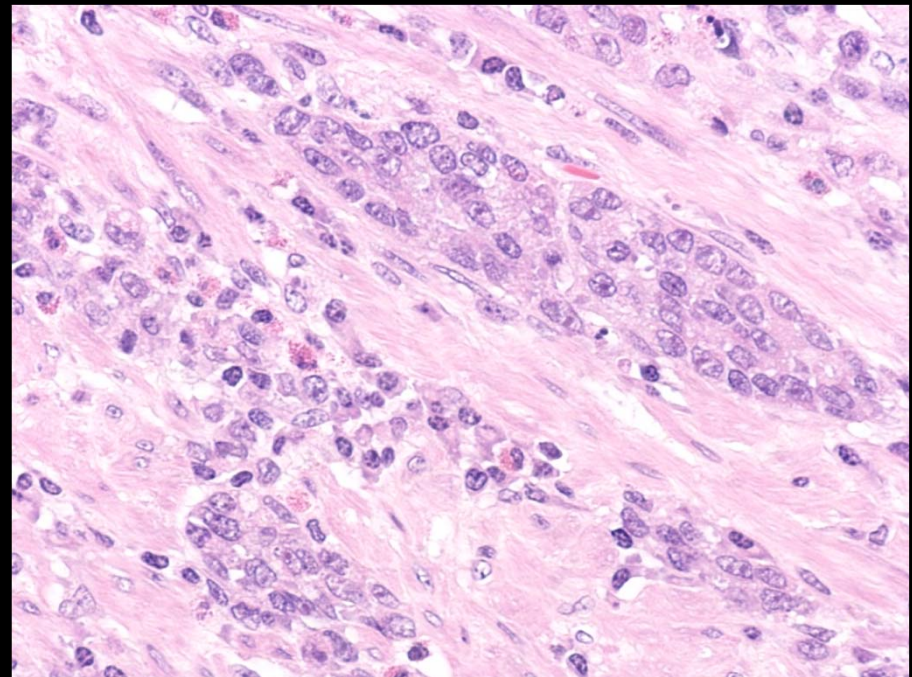
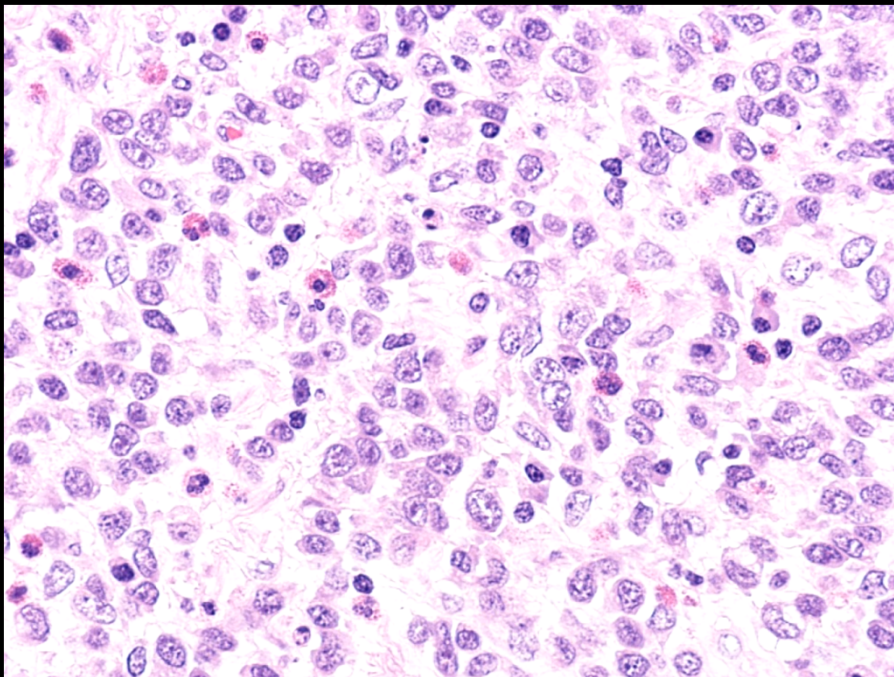
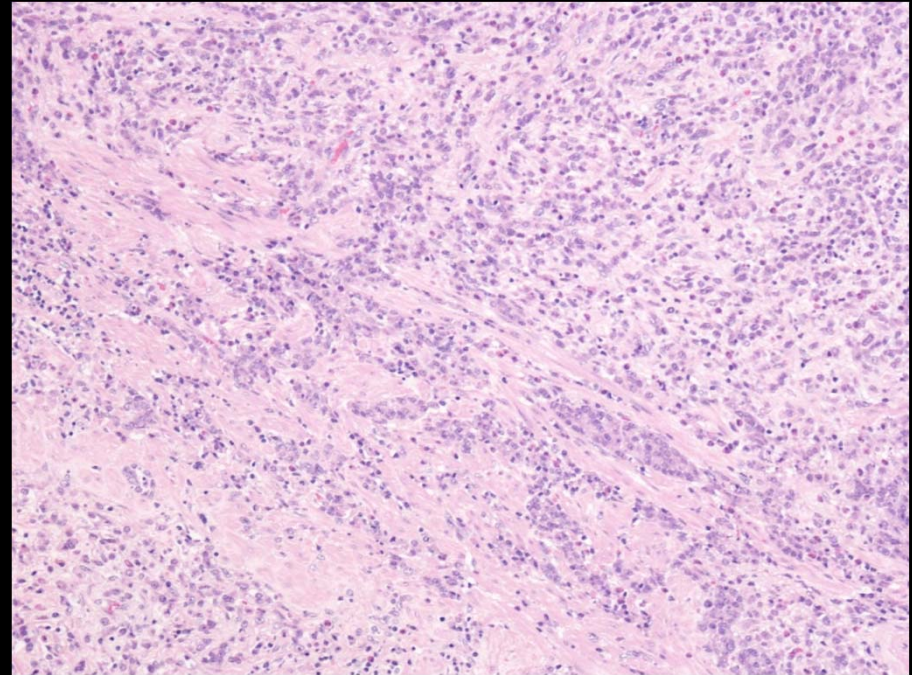


PAS染色

胃全摘出術組織像

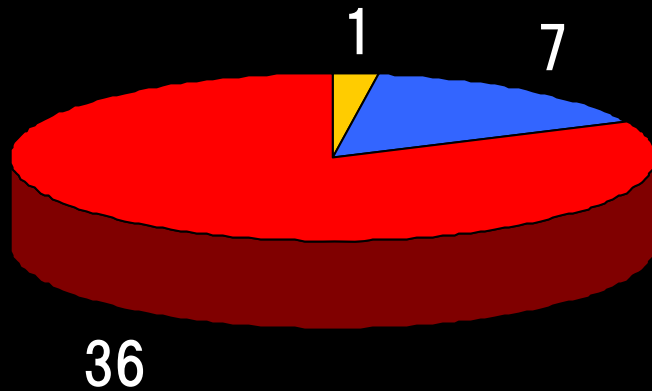
Poorly differentiated adenocarcinoma,
non-solid type.

不整形核を有する癌細胞が、
孤立散在性、小塊状、索状、
部分的には小胞巣状を呈して
増殖・浸潤している。



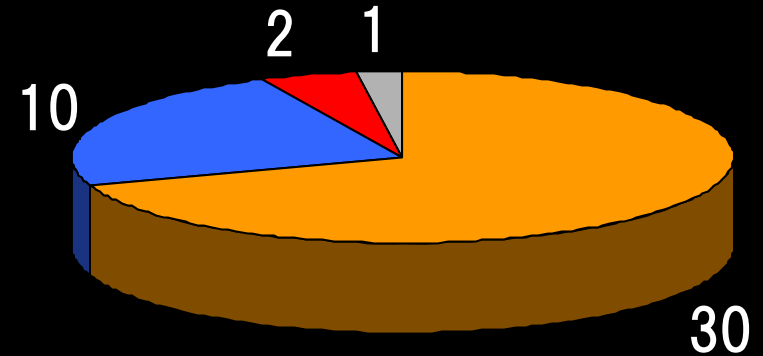
標本①(従来法)の集計

細胞判定



- 良性
- 悪性疑い
- 悪性

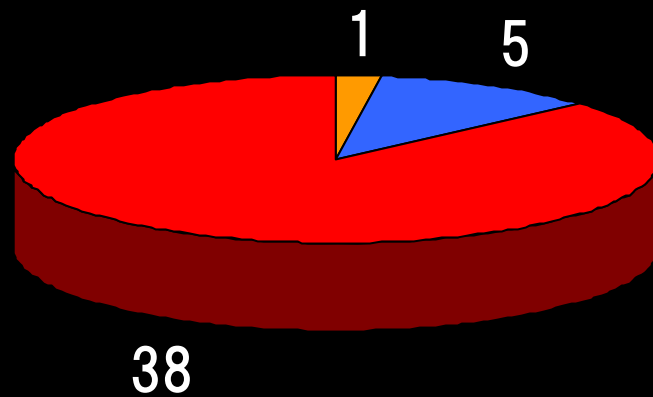
推定組織型



- 腺癌 (69.8%)
- 非ホジキンリンパ腫 (23.3%)
- 癌(低分化～未分化型) (4.7%)
- 悪性(組織型不明) (2.3%)

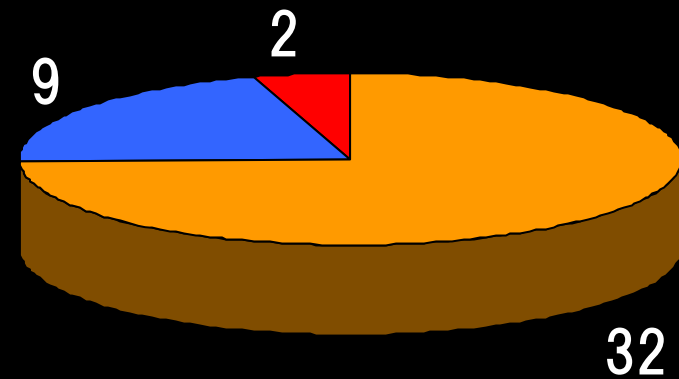
標本②(LBC PREP法)の集計

細胞判定



- 良性
- 悪性疑い
- 悪性

推定組織型



- 腺癌 (74.4%)
- 非ホジキンリンパ腫 (20.9%)
- 癌(低分化～未分化型) (4.7%)

結果

6点満点	30施設	(腺癌)
4点	2施設	(低～未分化の癌)
2点	11施設	(非ホジキンリンパ腫) (非ホジキンリンパ腫／腺癌) (組織型不明／腺癌)
0点	1施設	(良性)

細胞判定 考察 まとめ

今回配布した標本は腺癌の症例であったが、悪性細胞は小型で結合性が乏しかったため非ホジキンリンパ腫の回答が多く見られた。LBCには複数の標本を作製出来るという利点があるので、必要に応じて特殊染色や免疫染色を追加して判定して頂くことで組織型推定の一助になることが考えられる。今後はそのような配慮も必要であると思われた

配布した塗抹標本は細胞質の辺縁が不明瞭になったり、Papanicolaou染色するとエオジン好性の傾向が見られたため標本を配布する際の課題と思われた

3. LBC PREP標本の細胞数の評価

44施設の集計

細胞数のカウント

各施設から回収したLBC PREP標本の5カ所を対物レンズ20倍で鏡検し、その視野中の細胞をすべて数え5カ所の平均を算出した

コントロールとして配布用のサイトコレクト液固定検体を作製する際、5本ずつ分注しその1本をコントロール用に残し精度管理委員が標本を作製、その平均を算出し用いた

評価基準

LBC PREP作製標本で標本中の細胞数が十分に得られていること

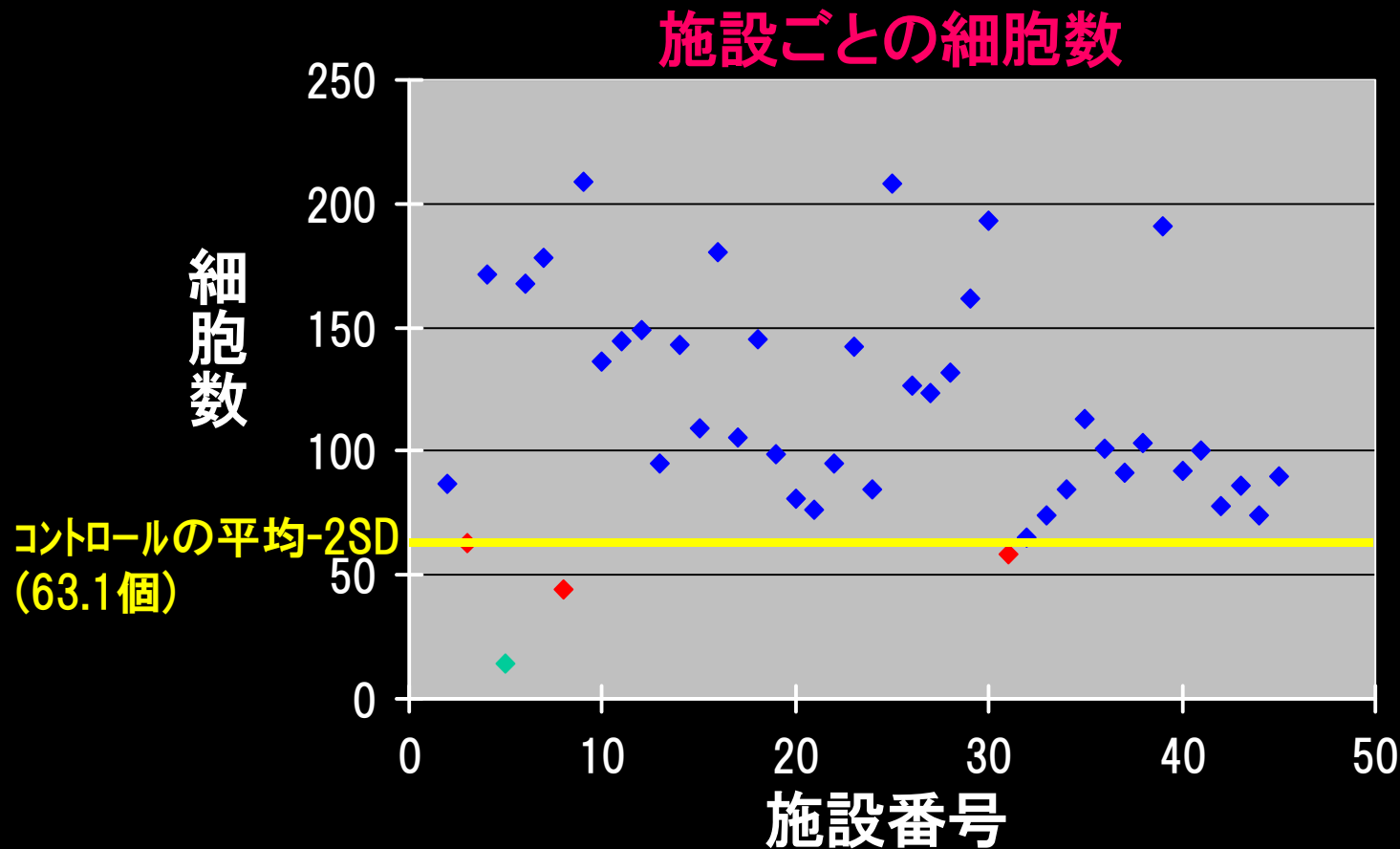
評価方法

コントロールの平均 $-2SD$ より多くの細胞が得られているか
精度管理委員の鏡検と併せて評価した

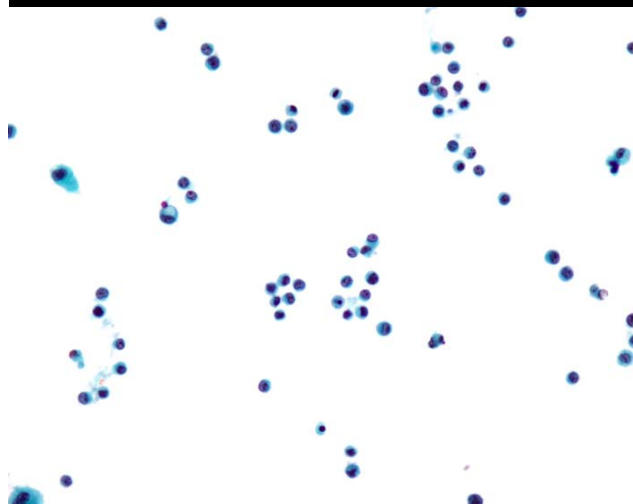
- ・細胞数が十分に得られている 4点
- ・細胞数がコントロールの平均 $-2SD$ に満たないが判定は可能 2点
- ・判定に支障をきたすほどの細胞少数 0点

結果

- ◆ 細胞が十分に得られていた施設 40施設
- ◆ 細胞がコントロールの平均-2SD(63.1個)に満たないが判定可能な施設 3施設
- ◆ 判定に支障をきたすほど細胞少数だった施設 1施設



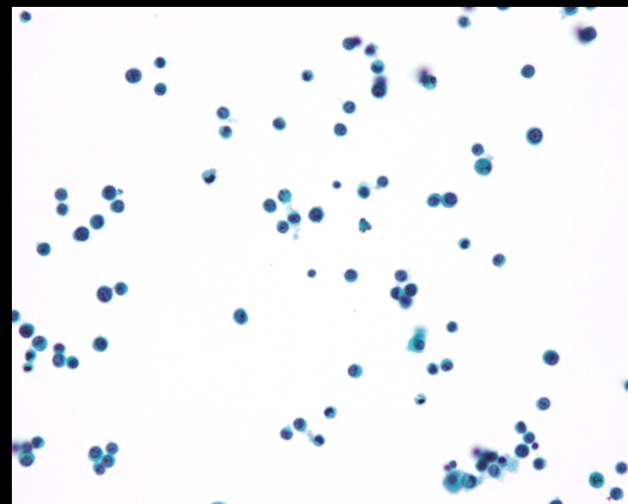
細胞の写真



細胞数の少なかった施設(1)
(平均62.8個 写真は63個)



細胞数の少なかった施設(2)
(平均44.4個 写真は39個)



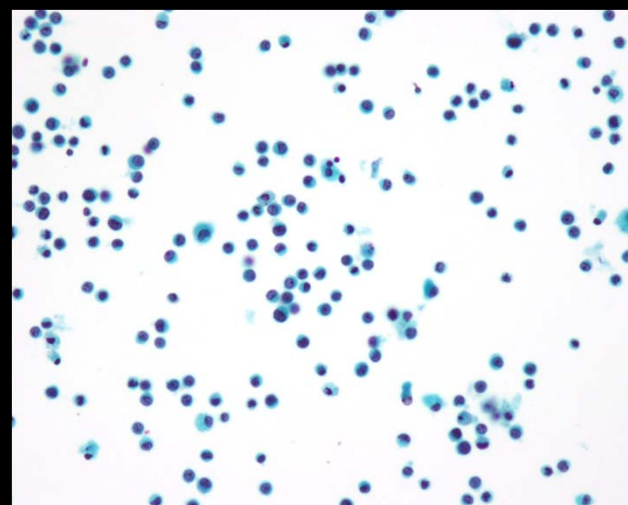
コントロール標本
(平均104.8個 写真は105個)



細胞数の少なかった施設(3)
(平均58.4個 写真は63個)



細胞数の少なかった施設(4)
(平均14個 写真は18個)



細胞数の多かった施設
(平均208.8個 写真は209個)

LBC PREP標本の細胞数の評価 考察 まとめ

採取細胞数はばらつきが出たが、極端に少ない施設はほとんどなくカットオフ値を下回った施設でも判定可能と思われる施設が多かった

ばらつきの原因として

- ☆サイトコレクト液で固定した検体を遠心後、上清を廃棄する段階で沈渣成分が上清とともに破棄されてしまった
- ☆精製水で再浮遊させる際十分に固定液が破棄されずスライドグラスとの接着が不十分であった
- ☆蓋にスライドグラスをセットして容器をひっくり返して静置しておく時間に施設間差があった

総合評価

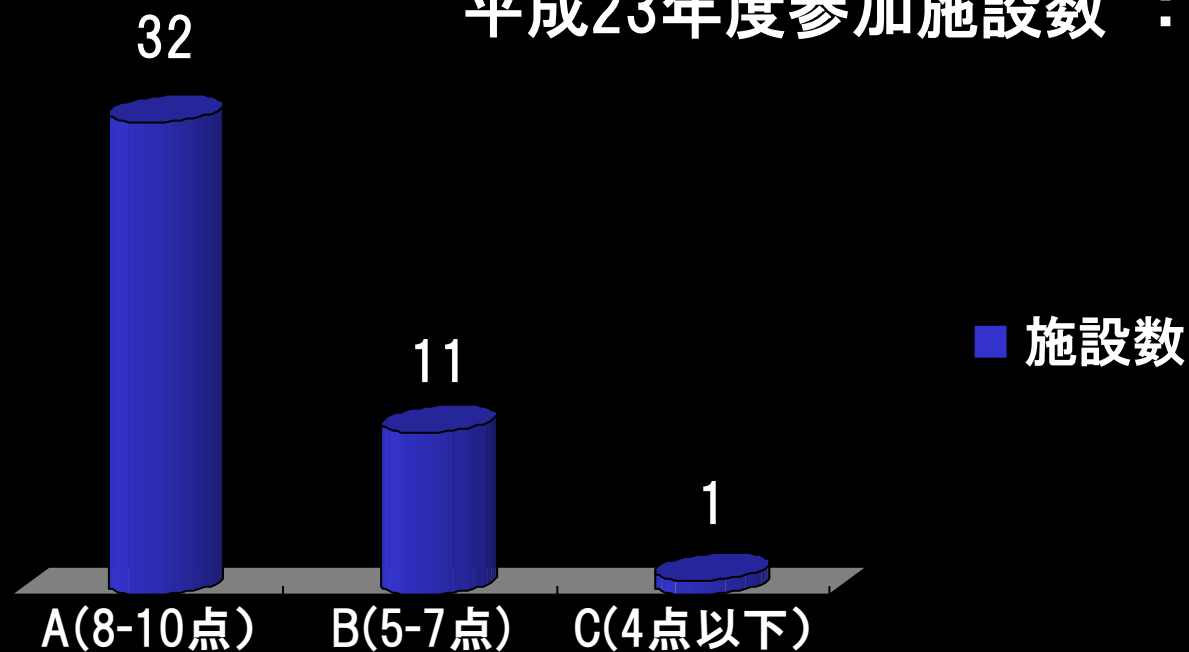
細胞判定評価(6点)とLBC PREP標本の細胞数の評価(4点)の合計点で評価

評価A : 8~10点

評価B : 5~7点

評価C : 4点以下

平成23年度参加施設数 : 44施設



参考

LBC PREPの基礎検討

1. LBC PREP法と従来法との癌細胞の核径、細胞(質)径の比較
2. LBC PREP標本を作製するとサイトコレクト液の何%の細胞が標本上にのるのか？
3. LBC PREP連続標本作製時の全細胞数の推移
4. 水とサイトコレクト液の割合における全細胞数
5. LBC PREP容器にスライドグラスをセットして静置しておく時間あたりの全細胞数

1. LBC PREP法と従来法との癌細胞の核径、細胞(質)径の比較

目的: 今回行ったアンケートのLBC PREP法と従来法との比較で核、細胞質がそれぞれ収縮すると感じる施設、変わらないとする施設、さらには膨化していると感じる施設など様々であった。そこで実際に計測を行い傾向を探った

従来法と比較したLBC PREP法の細胞変化(アンケート集計)

	核	細胞(質)
収縮する	12施設	29施設
膨化する	0施設	4施設
変わらない	15施設	12施設

方法

任意の10施設を選びLBC PREP法、従来法それぞれ1施設につき100個の癌細胞の核、細胞(質)の長径、短径をNikonの画像ソフト(NIS-Elements Documentation Ver3.00)を用いて対物レンズ40倍で測定し比較した。評価はt検定を用い危険率5%以下を有意差ありとした

結果

核の長径	従来法	LBC法
10施設の平均(μ m)	7.914	7.816
t検定	0.385(有意差なし)	
核の短径	従来法	LBC法
10施設の平均(μ m)	6.503	6.311
t検定	0.141(有意差なし)	
細胞(質)の長径	従来法	LBC法
10施設の平均(μ m)	9.959	10.176
t検定	0.068(有意傾向である)	
細胞(質)の短径	従来法	LBC法
10施設の平均(μ m)	9.242	9.52
t検定	0.011(有意差あり)	

考察

今回の検討で従来法に比べLBC PREP法は、癌細胞の核は変化せず細胞質は膨化するという結果が得られた。しかし今回の従来法とした標本は迅速コーティング剤を塗布した標本のため純粋な従来法の標本とは異なる可能性がある。したがってより日常業務で作製する標本に近い材料で検討する必要性が考えられた。

2. LBC PREP標本を作製するとサイトコレクト液の何%の細胞が標本上にのるのか？

今回配布したサイトコレクト液中の有核細胞数
3000000個

対物レンズ20倍の視野(写真)の面積:0.136mm²

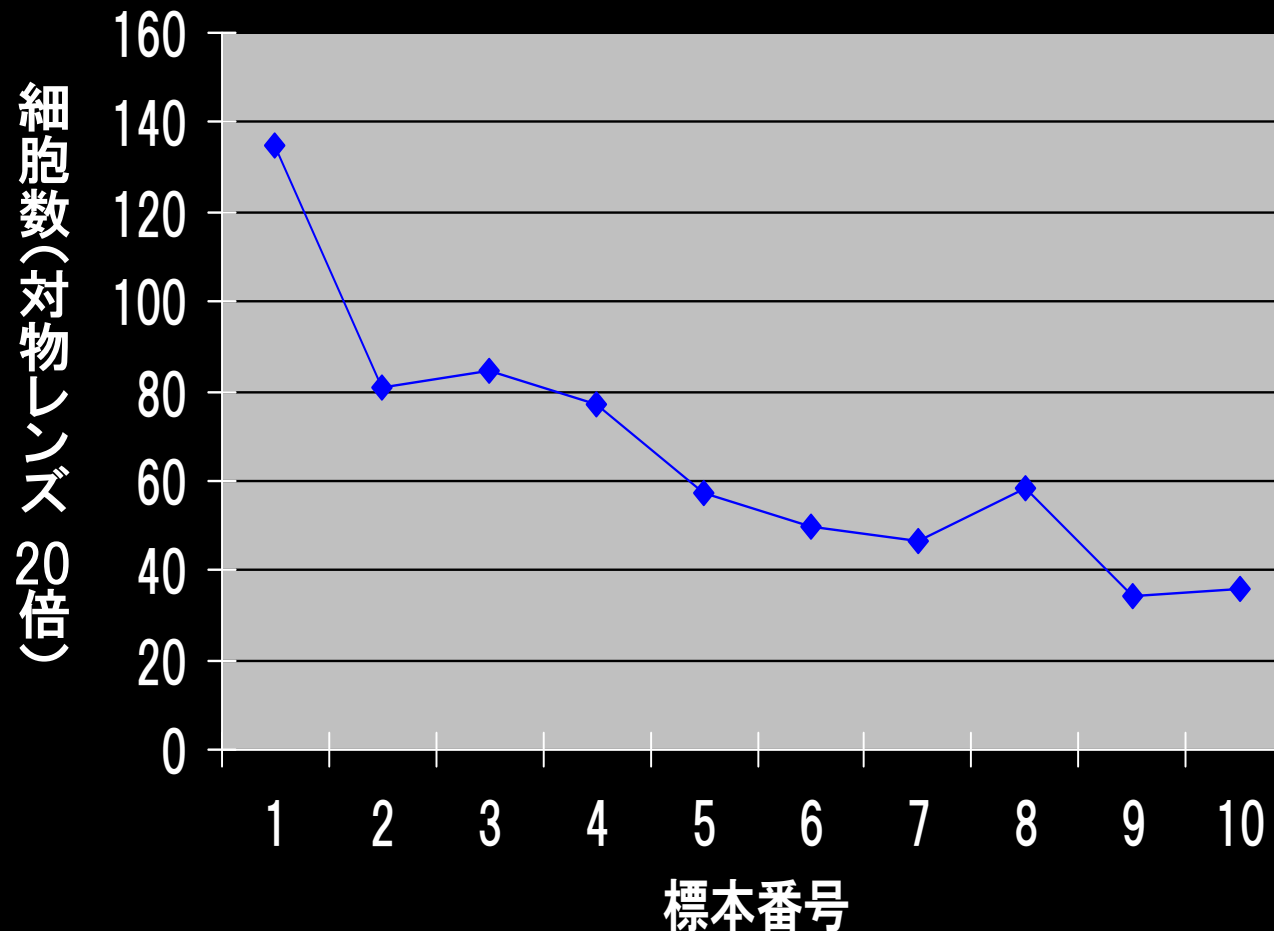
LBC PREP標本(半径1cmの円)とすると

LBC PREP標本(コントロール)の平均
241964.7個(サイトコレクト液15ml中の細胞の8.1%)

一番多かった施設(208.8個)
482082.4個(サイトコレクト液15ml中の細胞の16.1%)

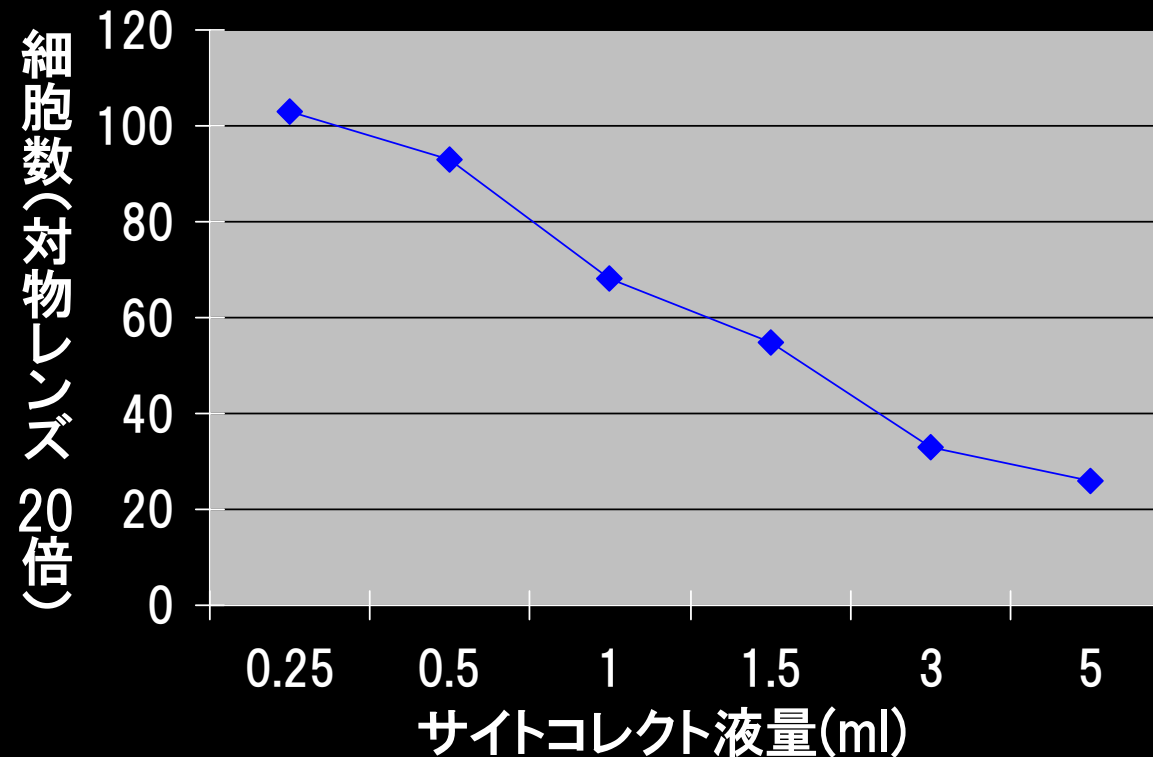
3. LBC PREP連続標本作製時の全細胞数の推移

今回配布したサイトコレクト固定検体1本から連続して10枚の標本作製し全細胞数を対物レンズ20倍で3カ所計測。その平均を算出し推移を調べた



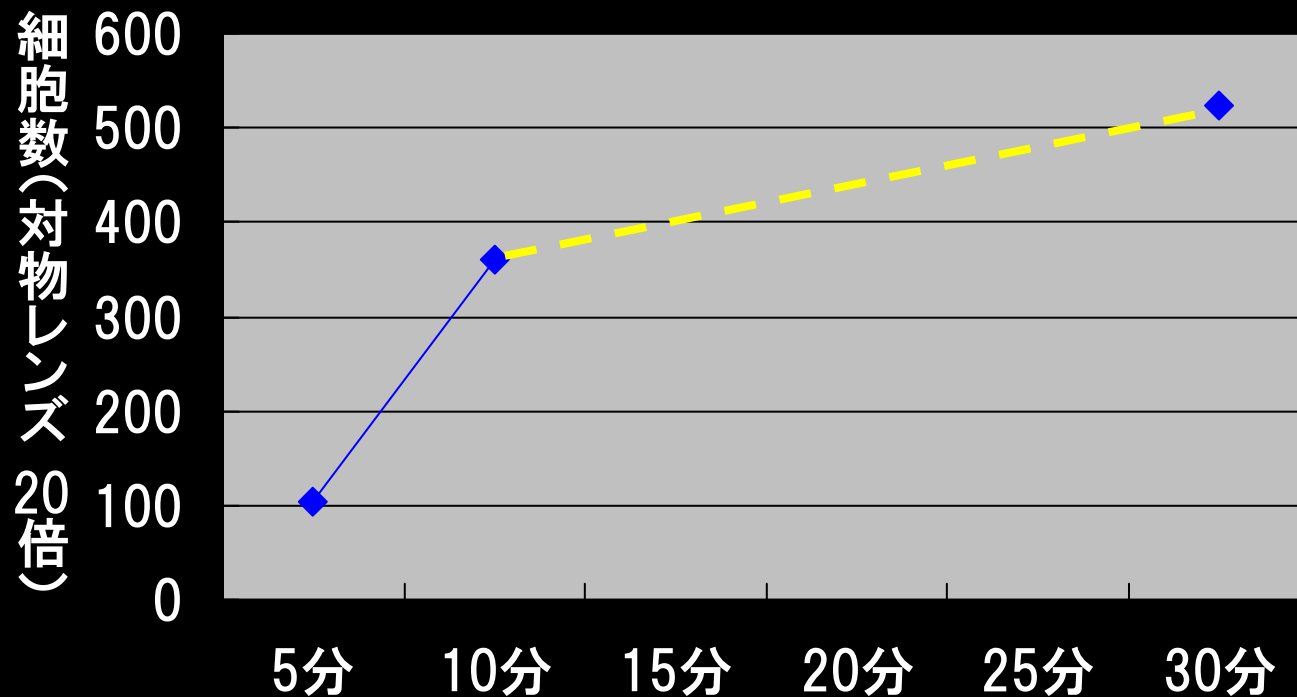
4. 水とサイトコレクト液の割合における全細胞数

LBC PREP標本を作製する際、精製水を用い再浮遊させる課程で十分に固定液が破棄されないとスライドグラスとの接着が不十分になる。そのため沈渣を精製水5mlで再浮遊させそこに任意の液量のサイトコレクト液を添加し標本作製。サイトコレクト液が及ぼす細胞数の変化を対物レンズ20倍で計測し調べた



5. LBC PREP容器にスライドガラスをセットして静置しておく時間あたりの全細胞数

LBC PREP標本中の細胞数はLBC PREP容器にスライドガラスをセットして静置しておく時間に左右されることが考えられるため5分、10分、30分静置して作製した標本を対物レンズ20倍視野で計測し全細胞数の推移を調べた



総括

LBCが普及し始めた中、初めてLBCを用いた精度管理を行った。LBCを初めて行う施設も多かったがLBC PREP標本の塗抹細胞数の点でほとんどの施設が十分に得られていた。今後も異なった角度からLBCを利用した精度管理を続けていきたいと考える

千臨技細胞診検査研究班精度管理委員（五十音順）

- | | | |
|------|-------------------|-----|
| 有田茂実 | （千葉県がんセンター） | 班長 |
| 岩崎聖二 | （国立がんセンター東病院） | |
| 北村 真 | （東邦大学医療センター佐倉病院） | |
| 須藤一久 | （千葉県立佐原病院） | 副班長 |
| 仙波利寿 | （千葉大学医学部附属病院） | |
| 曾川紀子 | （千葉大学医学部附属病院） | |
| 時田和也 | （国立がん研究センター） | |
| 永澤友美 | （（株）江東微生物研究所千葉支所） | |
| 丸 喜明 | （千葉県こども病院） | |
| 渡邊孝子 | （帝京大学ちば総合医療センター） | |