

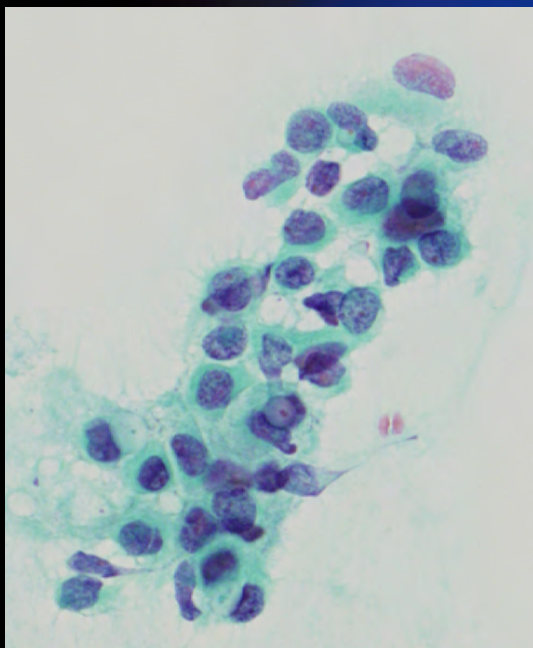
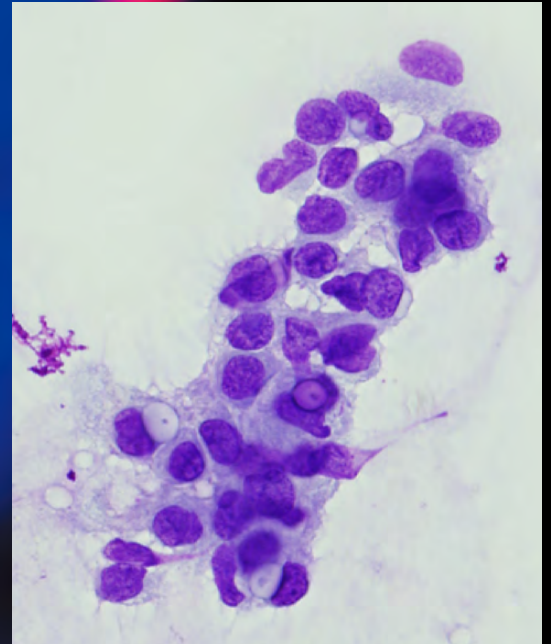
ONLINE ISSN 1882-7233
PRINT ISSN 0387-1193

日臨細胞誌
J.Jpn.Soc.Clin.Cytol.

第60卷 第3号 令和3年5月

日本臨床細胞学会雑誌

THE JOURNAL
OF THE JAPANESE
SOCIETY OF CLINICAL
CYTOLOGY



公益社団法人
日本臨床細胞学会

<http://www.jscc.or.jp/>

Vol.60 No. **3**
May 2021

目次

巻頭言.....加藤 久盛

〈原 著〉

オンサイト迅速細胞診における湿固定簡易ギムザ染色の有用性
.....兵庫医科大学病院病院病理部 糸山 雅子・他 (141)

〈症 例〉

術後に形成された空洞に再発をきたした乳頭状腎細胞癌の1例
.....東京女子医科大学病院中央検査部病理検査室 橋本 哲也・他 (150)

〈特 集〉 甲状腺細胞診——さらなる発展へ向けての展望——

特集によせて
.....大森赤十字病院検査部 坂本 穆彦・他 (156)

甲状腺細胞診における穿刺法・塗抹法のコツ
.....隈病院病理診断科 廣川 満良 (157)

甲状腺領域における LBC 検体の有効活用
.....福島県立医科大学医学部甲状腺内分泌学講座 山谷 幸恵 (164)

甲状腺乳頭癌亜型の細胞像とその推定意義
.....隈病院病理診断科 樋口観世子 (171)

甲状腺腫瘍におけるゲノム異常と展望
.....山梨大学医学部人体病理学 近藤 哲夫 (182)

甲状腺細胞診報告様式ベセスダシステムの評価
.....大森赤十字病院検査部 坂本 穆彦 (187)

投稿規定.....(192)

編集委員会.....(202)

＊

〈表紙写真〉

オンサイト迅速細胞診における湿固定簡易ギムザ染色の有用性

(左：ギムザ染色後，パパニコロウ再染色，右：ギムザ染色) (糸山雅子・他，左：Photo. 3b，右：Photo. 3a，ともに144頁)

CONTENTS

Editorial.....	Hisamori Kato
Original Article	
Usefulness of simple Giemsa staining with wet fixation in rapid on-site cytology Masako Itoyama et al. (Dept. of Surg. Path., Hyogo College of Med. Hosp., Hyogo)	(141)
Clinical Article	
Papillary renal cell carcinoma with retroperitoneal recurrence and peritoneal dissemination —A with the report of the cytological findings— Tetsuya Hashimoto et al. (Lab. of Path., Tokyo Women's Med. Univ. Hosp., Tokyo)	(150)
Special Articles Prospective views for aiming at progress in thyroid cytology	
Thyroid fine needle aspiration cytology—The aspiration and smearing technique— Mitsuyoshi Hirokawa (Dept. of Diag. Path. and Cytol., Kuma Hosp., Hyogo)	(157)
Effective utilization of liquid-based cytology for thyroid lesions Yukie Yamaya (Dept. of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Med. Univ. School of Med., Fukushima)	(164)
Variants of Papillary Thyroid Carcinoma—Cytological features and diagnostic significance— Miyoko Higuchi (Dept. of Diag. Path. and Cytol., Kuma Hosp., Hyogo)	(171)
Genomic alteration in thyroid tumors Tetsuo Kondo (Dept. of Path., Univ. of Yamanashi, Yamanashi)	(182)
An evaluation of The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology Atsuhiko Sakamoto (Dept. of Path. and Lab. Med., Omori Red Cross Hosp., Tokyo)	(187)
Notice to contributors.....	(192)
Cover Photo	
Usefulness of simple Giemsa staining with wet fixation in rapid on-site cytology (Left : Pap. restaining after initial Giemsa stain, Right : Giemsa stain) (Masako Itoyama, et al., Left : Photo. 3b, Right : Photo. 3a, p144)	



巻頭言

Hisamori Kato

加藤久盛

細胞検査士委員会委員長

神奈川県立がんセンター婦人科

▶ 細胞検査士委員会の役割について



2015年より細胞検査士委員会の委員長を拝命しておりますが、細胞検査士委員会ではどのような活動をしているか、ご紹介したいと思います。

まず毎年行われている細胞検査士資格認定試験の運営であります。

細則に細胞診検査士資格認定試験委員長は、原則として細胞検査士委員長が行うこととなっております。第1回は1969年に開始されて、昨年で第53回となりました。ここで歴代の委員長を調べてみました。

橋本敬祐、田中 昇、石東嘉男、澤田勤也、長谷川寿彦、坂本穆彦、

工藤隆一、馬場雅行、廣岡保明、越川 卓の方々が委員長を務められています（敬称略）。そうそうたるメンバーが担当されていることがわかりますが、それぞれの委員長が試行錯誤を重ね現在の試験体制を築き上げられました。着任して年々この歴史の重みを実感しております。さて現在の試験は、1次試験として筆記試験、その合格者が2次試験として顕微鏡を用いたスクリーニング及び同定、手技（2020年は新型コロナ感染対策のため手技中止）の科目で判定し最終合格者を決定しています。以前は関係者のご協力で格安の会場確保ができており、会場設定で大きな混乱なく運営してまいりました。ところが新型コロナ感染拡大が始まった2020年の第53回からは、2次試験会場として以前利用していた会場も施設側の理由で使用困難となりました。同時にソーシャルディスタンスの確保、十分な換気システム、衛生環境の整った会場を整える必要がありました。会場探しには事務局含め、関係委員の人脈も使い最終会場決定まで大変な作業を要しましたが、何とか、新型コロナ感染のクラスターも発生することなく無事に終えることができました。責任者として安心したと同時に関係者のご尽力に心より感謝申し上げます。2021年の新型コロナ感染状況も全く予測ができない中、安全にかつ本来の精度を保った試験内容を維持すべく準備に入っております。受験生および関係者の方々には、例年通りの試験運用と異なることが予想されますが、事前に周知するよう努めますので、何卒この新型コロナ感染下での運営にご協力お願い申し上げます。

さて当委員会は新規の細胞検査士養成課程施設の新規申請依頼があった場合、養成施設にふさわしい環境があるか検討しています。大事なものは、設立の目的、実施期間、定員が明記されているか、非常勤ではなく専属での細胞診専門医及び細胞検査士の必要人数が着任しているか、現有する標本（ガラス）の内容と標本数が十分であるか、講義と実習科目で900時間以上の計画があるか、分担教官の詳細、備品、所蔵著書一覧の詳細などを十分に検討し、妥当と判断されたならば理事会に諮り決定しております。細胞診養成施設は一時期、応募を中止する施設もありましたが、ここ数年は複数の大学の新規養成施設が増えてまいりました。申請許可した後も定期的に申請時の内容が維持できているか、委員会と



して調査していく予定であります。

また当委員会内委員会である細胞検査士資格更新審査委員会にて、細胞検査士資格取得後の資格更新業務にあたっております。単位取得のためには学術集会への参加も大きな割合を占めます。かねてより交通が不便な遠方の会員や、少ない人数で勤務している施設の会員より学会参加が難しいとのご意見をいただいております。そこでe-learning学習単位のシステムを開始しご意見に対応開始しております。そんな中、地域連携組織単位でのweb学会開催、あるいは講習会開催もこの社会事情を踏まえ増えてきております。また2020年6月の第61回日本臨床細胞学会総会（春期大会）より当学会学術集会として初のweb学会が開催されました。私もプログラム委員長を拝命し、当初うまくいくか心配でありましたが、佐藤之俊会長が見事に開催され過去最高の参加者数となる学会となりました。今後の学術集会の在り方を示すお手本の学会になりました。多くの会員が参加できたことは、細胞検査士の資格更新に必要な単位取得に対し新しいスタイルを提示することとなりました。

日本臨床細胞学会は複数種類の有資格者会員から成り立っている学会です。私もこの細胞検査士委員会の委員長を拝命し、細胞検査士の方々と一つの目標に向かって、ともに作業できる環境は何とも新鮮で、視野の広がる経験をさせていただきました。ややもすれば医師側からしか見てこなかった部分は多々あり、大いに勉強になっています。これからも両方の立場を理解しコミュニケーションをいかに取り合っていくかが問われていきます。

今後は我が国でも子宮頸がん検診にHPV導入する方向で動き始めています。実際の運用レベルまでにはいくつかの問題点を解決する必要がありますが、心構えはしておく必要があります。本格的導入になった際は、これまでの細胞診単独時代のスクリーニング検体数も大きく変化してくることが予想されます。またゲノム医療においては病理検体でのコンパニオン診断が増えてきており、病理検査室の作業の重要性が増してきています。従来の細胞検査士の業務をこなせるだけでなく、新しい時代にも対応できる細胞検査士へのステップアップにお役に立てればと思っております。

原 著

オンサイト迅速細胞診における湿固定簡易ギムザ染色の有用性

糸山 雅子 中村 純子 佐藤 元 石田 圭子
 榎本 利香 鳥居 良貴 石川 恵理 井出 良浩
 渡邊 隆弘 廣田 誠一

兵庫医科大学病院病院病理部

目的：当院では乳腺・甲状腺・唾液腺・リンパ節などの穿刺吸引細胞診（FNAC）および腭などの超音波内視鏡下穿刺吸引生検（EUS-FNAB）において、エタノール湿固定後に簡易ギムザ染色を用いてオンサイト迅速細胞診（ROSE）を実施している。今回、その有用性について検討した。

方法：FNAC、EUS-FNABのROSE検体に対し、湿固定簡易ギムザ染色で採取材料の適否を判定後、エタノールで再固定とともに脱色し、パパニコロウ染色で再染色した。湿固定簡易ギムザ染色とパパニコロウ再染色時の細胞像の比較を行った。

成績：湿固定簡易ギムザ染色は、ギムザ染色の特性を利用して多くの情報を得ることができた。また、湿固定簡易ギムザ染色標本は、パパニコロウ再染色が行えることから、見慣れた染色で同じ細胞をスクリーニング・再観察ができた。

結論：湿固定簡易ギムザ染色の細胞像は、パパニコロウ再染色時の細胞像との間に違和感がなく、ギムザ染色の特性を含め多くの情報を得ることができることから、ROSEに際して有用と考えられた。また検体採取時にすみやかに固定液に浸漬するため、感染防止効果が高いものとする。

Key words : Rapid on-site cytologic evaluation, Giemsa, Wet fixation

I. はじめに

穿刺吸引細胞診（fine needle aspiration cytology：以下FNAC）や超音波内視鏡下穿刺吸引生検法（endoscopic ultrasound-fine needle aspiration biopsy：以下EUS-FNAB）

Usefulness of simple Giemsa staining with wet fixation in rapid on-site cytology

Masako ITOYAMA, C. T., I. A. C., Junko NAKAMURA, C. T., I. A. C., Gen SATO, C. T., I. A. C., Keiko ISHIDA, C. T., I. A. C., Rika ENOMOTO, C. T., I. A. C., Yoshitaka TORII, C. T., I. A. C., Eri ISHIKAWA, M. D., Yoshihiro IDE, M. D., Takahiro WATANABE, M. D., Seiichi HIROTA, M. D.

Department of Surgical Pathology, Hyogo College of Medicine Hospital

論文別刷請求先 〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町1の1 兵庫医科大学病院病院病理部 糸山雅子

令和2年1月23日受付

令和2年5月14日受理

施行時のベッドサイドでの迅速細胞診（rapid on-site cytologic evaluation：以下ROSE）は、不慣れた検体処理による細胞の乾燥・膨化などを防止するためだけでなく、採取された細胞診検体・生検組織の量的・質的評価を目的として多くの施設で行われている^{1,2)}。当院においても、乳腺内分泌外科外来でのFNAC検体や大針生検（core needle biopsy）検体、吸引式組織生検検体、耳鼻咽喉科・頭頸部外科外来における甲状腺・唾液腺・リンパ節などのFNAC検体、さらには内視鏡センター・放射線医療センターでの粘膜下腫瘍・腭腫瘍・リンパ節などに対するEUS-FNAB検体に対し、細胞検査士が立ち会ってROSEを行っている。

ROSEにおける染色法としては、湿固定を行った後のシヨール染色³⁾や乾燥固定から生理食塩水による再水和法を用いる超迅速パパニコロウ染色^{4,5)}、乾燥固定による簡易ギムザ染色⁶⁾などが用いられているが、湿固定による簡易ギムザ染色はほとんど行われていない。今回われわれは、ROSEに際してエタノールによる湿固定後に簡易ギムザ染

Table 1 Comparison between simple Giemsa staining with wet fixation and conventional Giemsa staining

	Simple Giemsa staining with wet fixation	Conventional Giemsa staining
Fixation	With 99.5% ethanol	With methanol after air drying
Cell retention	Good	Good
Observation of overlapping cells	Observable	Difficult to observe
Metachromasia	Vivid red purple	Red purple
Granules	Clear	Clear
ICL	Clear	Clear

色⁷⁾を行い、細胞像を詳細に観察してその有用性を検討したので報告する。

II. 対象および方法

当院では2006年よりROSEを開始したが、湿固定による簡易ギムザ染色は2010年より導入した。今回の検討は特に2018年1月～2019年12月までに実施された乳腺内分泌外科や耳鼻咽喉科・頭頸部外科外来で実施されるFNACおよび生検組織採取時の捺印標本、内視鏡センター・放射線医療センターでのEUS-FNAB採取時の捺印・圧挫標本に対して行った。内訳は、乳腺FNACおよび大針生検（core needle biopsy）・吸引式組織生検検体採取時の捺印標本145例、甲状腺FNAC 23例、唾液腺FNAC 18例、EUS-FNAB採取時の圧挫標本のうち腭腫瘍 37例・胃粘膜下腫瘍 26例について検討を行った。また参考として、術中迅速診断時の捺印標本 5例、経気管支擦過細胞診材料 1例、液状化検体細胞診（liquid-based cytology：以下LBC法）検体 3例についても同様の染色を行った。

検体採取後、すみやかに99.5%エタノールで湿固定し、ヘマカラー迅速染色セット（メルク社）を用いた簡易ギムザ染色⁸⁾を行い、採取材料の適否を判定するとともに詳細な細胞観察を行った。検討を行うにあたり、ROSE時に湿固定による簡易ギムザ染色を用いて細胞採取の適否に用いた検体は、検査室に持ち帰った後、パパニコロウ染色またはアルシアン青染色を行い、鏡検している。操作手順は以下の通りである。

- ①検体採取。
- ②99.5%エタノールによる湿固定 10（～30）秒。
- ③ヘマカラー溶液 2 赤色液に、3～5 回軽く浸漬。
- ④ヘマカラー溶液 3 青色液に、5～8 回軽く浸漬。
- ⑤pH7.2 リン酸緩衝液で 10～30 秒洗浄。
- ⑥洗浄後乾燥させずにそのままの状態で鏡検および判定。
- ⑦判定後すみやかに99.5%エタノールで再固定とともにギムザ染色の脱色。

Table 2 Metachromasia observed in 145 breast FNAC and imprinted FNAB specimens

Findings	Cases
Granules	
・ Neuroendocrine granules	
Mucinous carcinoma	4
Solid papillary carcinoma	2
・ Apocrine metaplastic granules	
Blue purple	13
Magenta	3
Mucus-like substance	
・ ICL	18
・ Interstitial mucus material	4
・ Pericapillary matrix in mucinous carcinoma	1

⑧病理検査室に戻った後に改めてパパニコロウ染色またはアルシアン青染色を行い、通常通りスクリーニング。

III. 結 果

ROSEに際して湿固定簡易ギムザ染色を行うことで、短時間での標本作製と、よりの確かな観察が可能となった。メーカーの推奨方法では標本乾燥後にメタノールによって固定するが、湿固定と乾燥固定では、細胞形態や集塊の見え方、色調に明らかな差異がみられた。多数の検討はできていないが、細胞の保持は双方とも良好で、乾燥固定のほうがやや優れていると思われた。ただし、ROSE時に湿固定簡易ギムザを行った標本は、その場でアルコールに戻して検査室でパパニコロウ染色をするため、同一症例での細胞像の詳細を比較できたのは数例のみである。両者の細胞形態には違いがみられ、乾燥固定では細胞は大きくみえるが、細胞質内の細かな観察には不向きであることがわかった。湿固定では乾燥固定に比して細胞が小さくみえるが、個々の細胞の膨らみと透明感により、細胞質内の観察や重積する細胞の観察に適していた。さらに異染性顆粒については、どちらの固定方法においてもはっきりと確認することができたが、色調において湿固定のほうがより鮮やかに

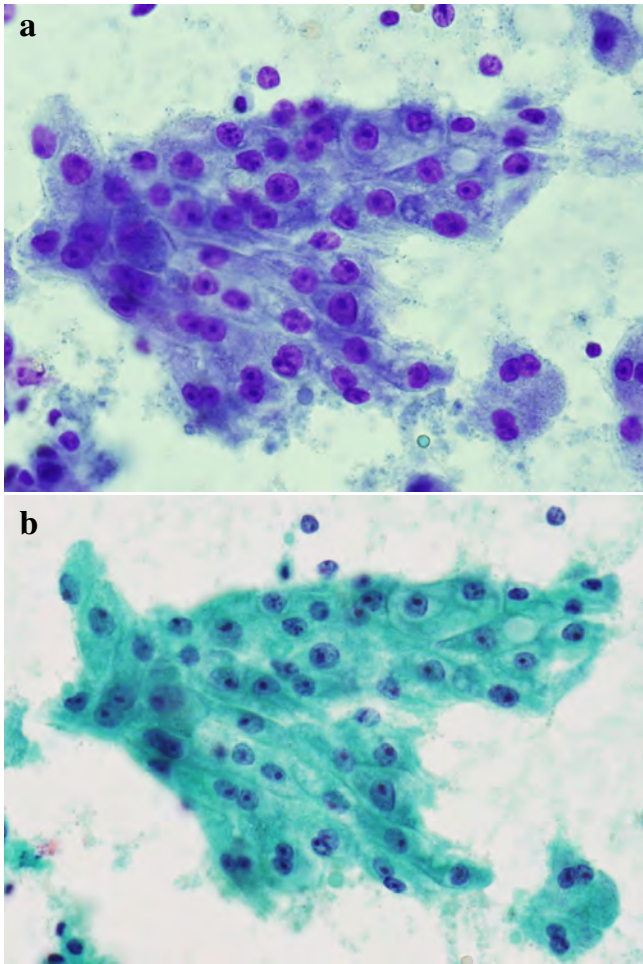


Photo. 1 Cytological findings of apocrine metaplastic cells on breast FNAC.

a : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.

b : Pap. restaining after initial Giemsa staining, $\times 40$.

強調された赤紫色にみられた (Table. 1).

今回の方法における湿固定による簡易ギムザ染色での細胞所見を以下に述べる。

乳腺のFNAC標本および生検採取時の捺印標本145例のうち、アポクリン化生細胞が認められた16例の中で、細胞質に充満する細かな顆粒が異染性を示した症例が3例、正染色性（または正染性）を呈した症例が13例であった (Table 2)。パパニコロウ染色で認められる顆粒の所見よりも強調されて観察された (Photo. 1)。ただし、顆粒の不透明なアポクリン化生細胞もみられた。

線維腺腫の13例においては、シート状に配列する乳管上皮細胞集塊とその周囲の双極裸核細胞の核内構造がわかりやすく保持されていた。筋上皮との二相性もわかりやすく、パパニコロウ染色時のヘマトキシリンの色よりも、双極裸核細胞が乳管上皮細胞集塊の表面に浮き上がるように紫色で確認された (Photo. 2)。

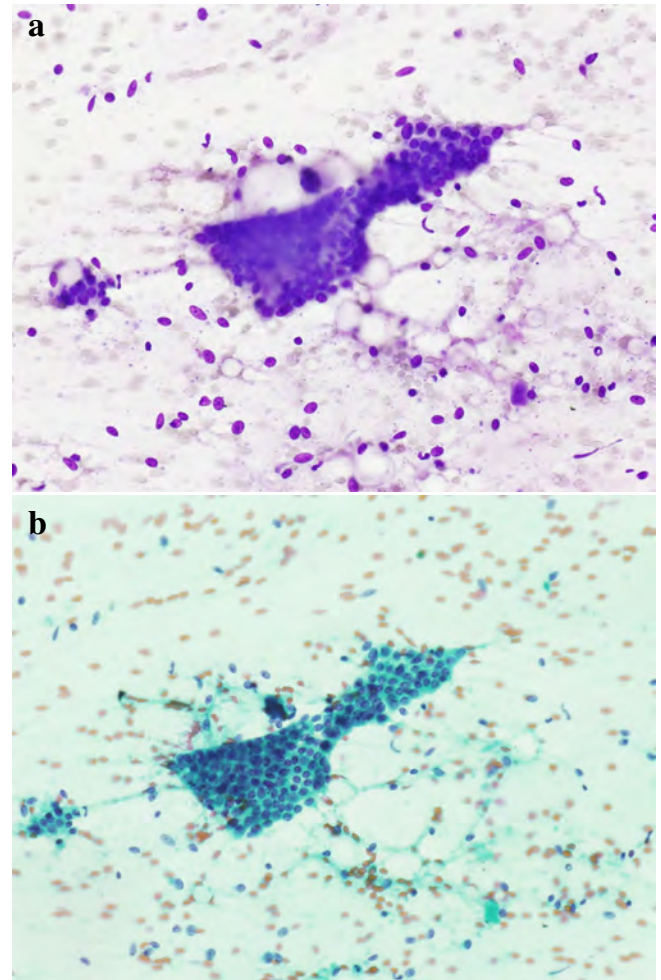


Photo. 2 Cytological findings of breast FNAC in a case of fibroadenoma.

A monolayered sheet of ductal epithelial cells admixed with naked bipolar myoepithelial nuclei in the background.

a : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 20$.

b : Pap. restaining after initial Giemsa staining, $\times 20$.

浸潤性乳管癌硬性型や小葉癌で観察されることの多い細胞質内小腺腔 (intracytoplasmic lumina : 以下 ICL) には、細胞質の腔内に濃縮した分泌物をみる I 型と、空胞が強調される II 型があるが、重積する細胞集塊内に紛れるように存在する I 型・II 型のどちらの ICL も明瞭に観察され、また I 型 ICL にみられる濃縮した粘液も異染性を示し、明瞭に確認することができた (Photo. 3, Table 2)。

細胞質に出現する異染性顆粒の代表的な例として神経内分泌顆粒が挙げられるが、形質細胞様の腫瘍細胞が緩い結合性を示して出現する乳腺の充実乳頭癌2例では、細胞内に赤紫色の微細な顆粒が核と反対側の辺縁にみられた。この顆粒はすべての腫瘍細胞にみられるのではなく、集塊内よりは散在する腫瘍細胞に確認されることが多かった。神

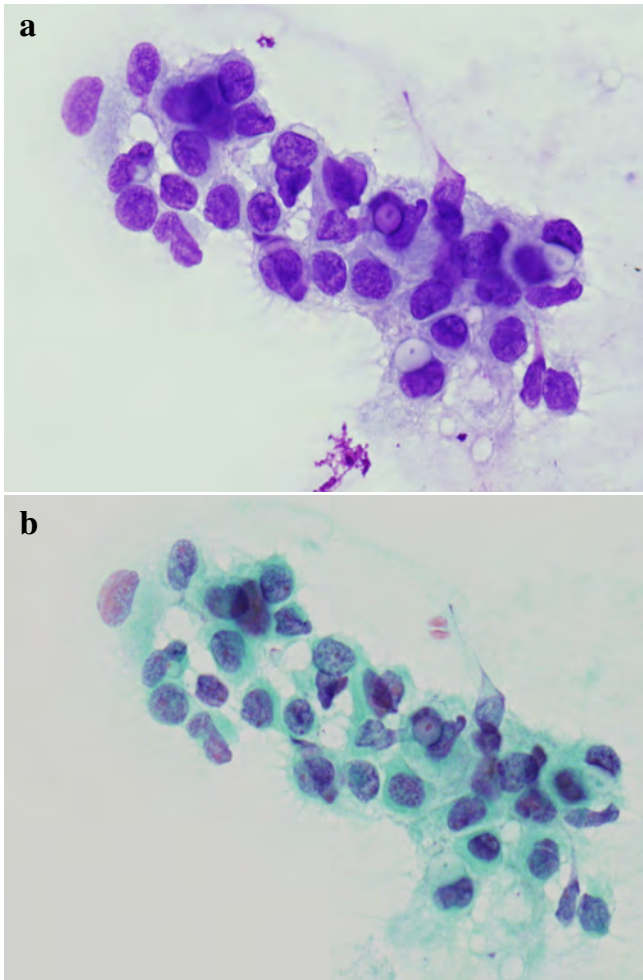


Photo. 3 Cytological findings of intracytoplasmic lumina on breast FNAC in a case of invasive lobular carcinoma.
a : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.
b : Pap. restaining after initial Giemsa staining, $\times 40$.

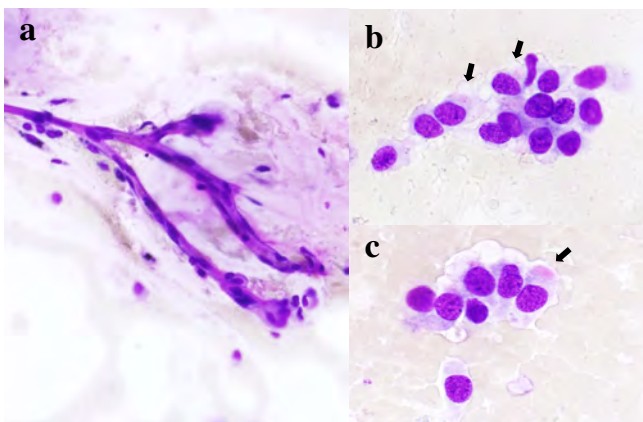


Photo. 5 Cytological findings of branching capillaries (a) and neuroendocrine granules (arrows) on breast FNAC in a case of mucinous carcinoma (b, c).
a, b, c : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.

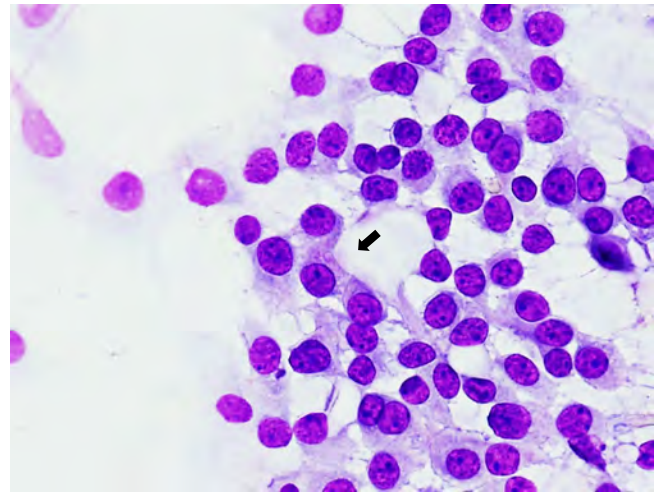


Photo. 4 Cytological findings of neuroendocrine granules showing metachromasia (arrow) on breast FNAC in a case of solid papillary carcinoma.
Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.

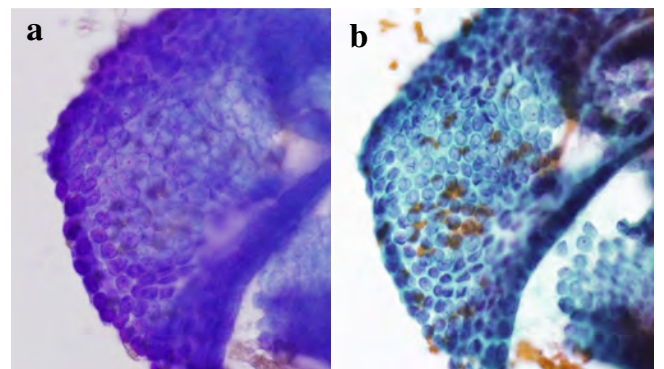


Photo. 6 Cytological findings of nuclear ground-glass appearance and nuclear grooves on thyroid FNAC in a case of papillary carcinoma.
a : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.
b : Pap. restaining after initial Giemsa staining, $\times 40$.

経内分泌顆粒は、神経内分泌癌だけではなく、乳腺の充実乳頭癌や神経内分泌分化を伴う粘液癌にもしばしばみられることから重要な所見である (Photo. 4)。粘液癌の4例では、背景に異染性を示す間質粘液がみられた。また1例では、細く分岐した毛細血管もみられた。特に毛細血管周囲に一致して強い異染性が認められた (Photo. 5, Table 2)。

耳鼻科領域の穿刺吸引材料においては、甲状腺乳頭癌の3例において平面的でシート状に配列する細胞集塊に、核内の微細なクロマチンや小型核小体・核溝が明瞭に認められた (Photo. 6)。

唾液腺腫瘍の多形腺腫2例では、粘液腫様間質や基底膜様物質は、パパンニコロウ染色で通常ライトグリーン好性や淡紫性の無構造物質として出現するが、簡易ギムザ染色で

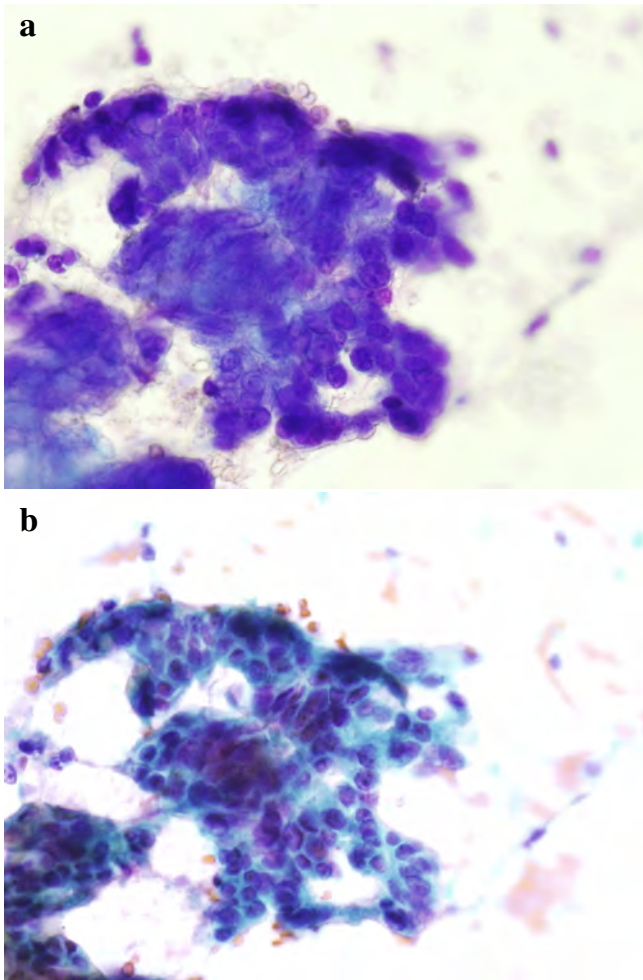


Photo. 7 Cytological findings of pancreatic cancer cells on EUS-FNAB (crush preparation).
 a : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.
 b : Pap. restaining after initial Giemsa staining, $\times 40$.

は異染性を示す物質として出現していた。

膵癌のEUS-FNAB施行時の圧挫標本では、厚みのある細胞集塊が採取され、通常の乾燥固定によるギムザ染色では集塊内の細胞所見を観察することは困難なことが多い。しかし、今回37例の膵臓EUS-FNABの圧挫標本のうち、簡易ギムザ染色を行った2例では、パパニコロウ染色で観察できるよりも、より輪郭のはっきりした細胞質内の粘液空胞として確認できた(Photo. 7)。充実性偽乳頭状腫瘍は、血管を軸とした偽乳頭状集塊が特徴的な所見であり、血管周囲の間質性粘液が異染性を示した。

経気管支擦過細胞診材料では、採取された線毛円柱上皮細胞の線毛が赤紫色に染められており、重積した細胞集塊でも線毛の存在が明瞭であった(Photo. 8)。また、術中迅速時に提出された組織の捺印細胞診において行った湿固定簡易ギムザ染色でも、良好な結果が得られた。例えば、肺

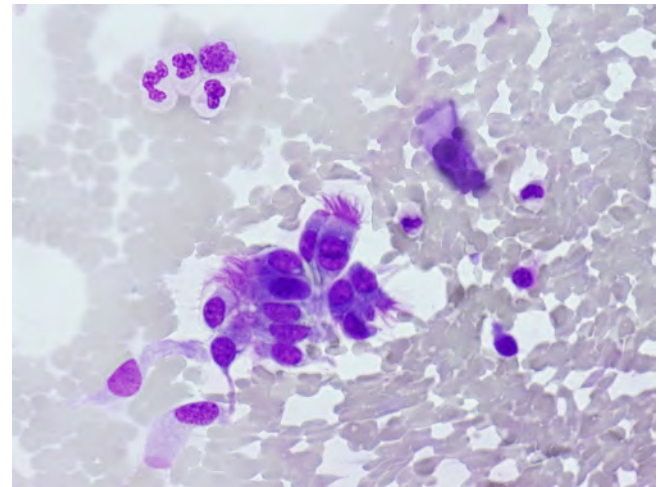


Photo. 8 Cytological findings of ciliated columnar cells on trans-bronchial brushing cytology.
 Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.

に転移した淡明細胞型腎細胞癌では、淡明な空胞状の細胞質や軽度に腫大した核・小型核小体の観察が可能であり、周辺に存在した組織球との違いがはっきりと観察された(Photo. 9)。

IV. 考 察

細胞診におけるギムザ染色は、一般的にはパパニコロウ染色の補助的な染色法として使用されることが多い⁹⁾。また、ギムザ染色を行うとしても乾燥固定が実施されることが多いが、今回のように、ROSEに際して湿固定による簡易ギムザ染色を実施することは、以下に示すようにさまざまな点で有用であった。短時間での判定が求められるROSE時こそ、背景や細胞形態の所見が重要であり、ギムザ染色の特性を活かし、さらに湿固定という見慣れた細胞所見が得られることから、経験の浅い、もしくはギムザ染色を得意としない細胞検査士にとっても非常にみやすい染色と考えられた¹⁰⁾。

以下に染色手技、染色性と細胞所見に分けて、その概要を示す。

1. 染色手技および染色性について

短時間での判定を要求されるROSEにおいて、今回用いたヘマカラー迅速染色は早くも簡便に染色を行うことができた。まず、検体採取後すみやかに99.5%エタノールで湿固定を行ったが、固定時間は10秒程度の浸漬でも30秒以上浸漬した場合と同様の染色結果が得られた。一般的な固定液は、95%エタノールであるが、今回われわれは99.5%エタノールを用いた。当院では通常のルーチンにおいて、細胞診の固定液として使用しているのは95%エタノール

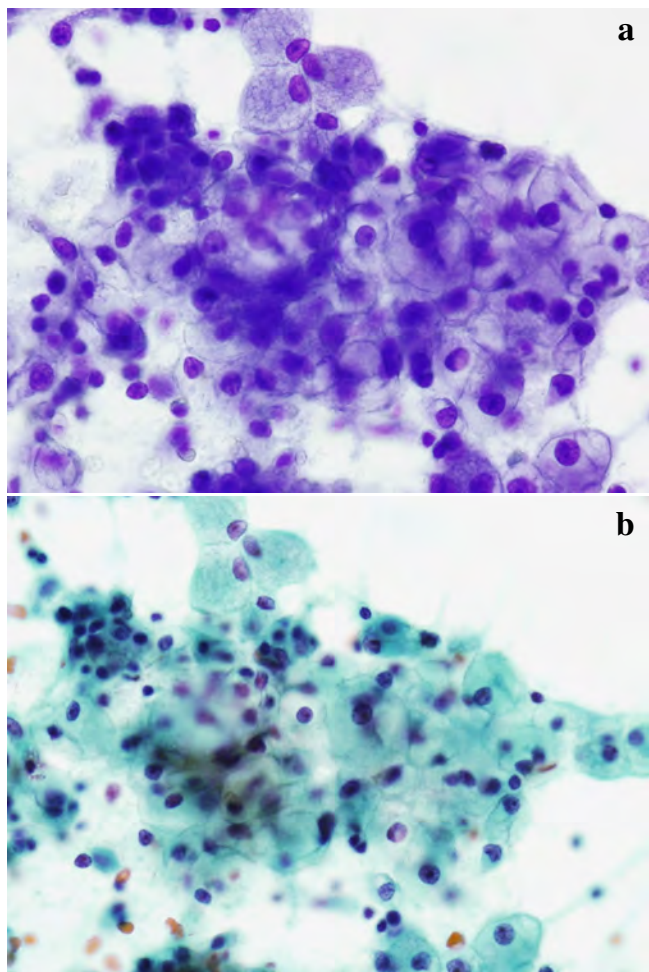


Photo. 9 Cytological findings in touch smear cytology of the lung in a case of metastatic clear cell renal cell carcinoma.
 a : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.
 b : Pap. restaining after initial Giemsa staining, $\times 40$.

であるが、内視鏡センターおよび耳鼻咽喉科において臨床医だけで細胞診検体を採取する場合には、95%への調整を省略し、市販されている99.5%エタノールの500 ml ボトルを固定液として提供している。99.5%エタノールで固定されて提出されたこれらの検体をパパニコロウ染色やアルシアン青染色で染色しても、全く遜色なくスクリーニングを行えていることから、ROSEにおいても導入可能と考え、今回も99.5%エタノールを固定液として用いた。

固定後すぐにヘマカラー溶液2赤色液に3~5回軽く浸漬、溶液3青色液に5~8回軽く浸漬するが、できるだけ細胞剥離を防ぐためには、ゆっくり上下させ、染色液がなじんだら動かさないことが良好な細胞保持につながるものと考えられた。また、赤色と青色のバランスは症例によって染色液への浸漬回数を変更することで、よりみやすい染色結果が得られた。当院でのROSE導入当初には、湿固定後にヘマトキシリンで核染色のみを行って採取細胞の量的・

質的な適否を施行医に報告していたが、短時間の湿固定直後に蒸留水で洗浄してヘマトキシリンで核染色後に鏡検し、蒸留水内に戻して病理検査室に持ち帰ってパパニコロウ再染色を行う工程は、細胞が非常に剥離しやすく、丁寧に液間の移動を行っても細胞の保持が困難であった。乾燥固定後のギムザ染色が細胞の保持率としては最も高い¹¹⁾が、今回の方法ではエタノール湿固定後に再度アルコールを含むヘマカラーの染色液に浸漬することで、剥離が最小限に抑えられたものと考えられる。ヘマカラー迅速染色セットの2種類の染色液にはともにアルコールが含まれており、これにより固定そのものも継続したため、細胞変性も抑えられたものと思われる。余剰色素の洗浄を行うリン酸緩衝液の操作は、ROSE時には染色液を除去する程度で十分であるが、時間に余裕がある場合は、しっかりと洗浄を行った方が顆粒がみやすくなり、また、細胞質や核のコントラストがよくなった。

採取細胞量の適否を判定して施行医に報告した後、再び99.5%エタノールに戻すが、この過程は簡易ギムザ染色の色素の脱色とともに細胞の再固定を進め、その後のパパニコロウ染色において良好な染色結果をもたらすものと考えられた。湿固定簡易ギムザ染色後の再染色としては、パパニコロウ染色以外にアルシアン青染色も可能である。当院では、ROSE時に簡易ギムザ染色後の標本をパパニコロウ染色だけでなく、アルシアン青染色にも用いているが、通常と同じ手順¹²⁾で染色を行えることも利点と考える。

実際のROSEに際して湿固定簡易ギムザ染色を用いるその他の利点として、染色の簡便さ、短時間での染色、さらに作業スペースが狭くても実施可能な点が挙げられる。ヘマカラー迅速染色セットを用いる場合、湿固定用エタノール溶液、ヘマカラー溶液2赤色液、ヘマカラー溶液3青色液、洗浄用リン酸緩衝液の4つの染色つぼの準備だけでよく、また、水洗用の流し台等は不要であり、狭い外来処置室などでの作業も効率よく行うことが可能なことから、ROSEに際して有用な染色法と考える (Photo. 10)。

2. 細胞所見について

これまで厚い塗抹検体や重積性のある細胞観察には乾燥固定ギムザ染色は不適とされてきた^{9,13)}。そのような検体においては、集塊内の核所見だけでなく、細胞構築の観察も困難な場合が多い。しかし、湿固定を実施することで、よりパパニコロウ染色に近い状態で染色され、乳腺FNACにおいて、増殖性の強い乳管上皮細胞など、重積性のある細胞集塊内でも個々の細胞の細胞質に透明感のある細胞所見が得られる。特に乳頭状増殖する乳管内乳頭腫や浸潤性乳管癌腺管形成型などは、異型細胞の不規則な重なり具合が観察しやすい。また、浸潤性乳管癌硬性型や小葉癌

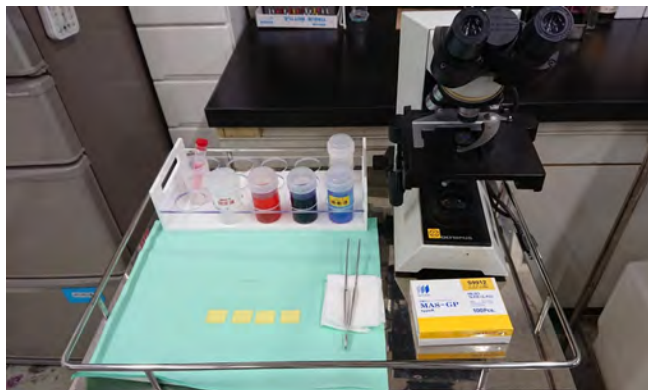


Photo. 10 Staining set for ROSE and microscope on the wagon.

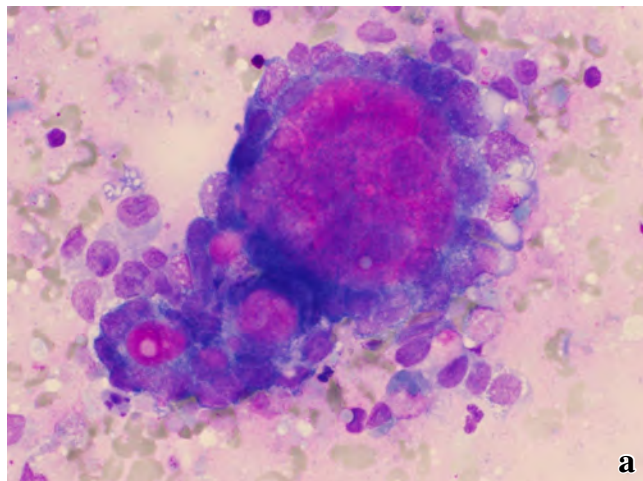
でしばしばみられる ICL や、核形、核小体なども、重積した細胞の中においても観察が容易であった。また、消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor : GIST) や隣腫瘍に対して最近頻用されている EUS-FNAB 施行時の圧挫標本においては、組織構築を残した分厚い検体の鏡検でも、核の性状や高円柱状の細胞の柵状配列、細胞内の粘液空胞、集塊周囲の粘液様物質の存在、神経内分泌顆粒の観察など、病変の推定に有用な情報を ROSE の時点で得ることが可能であった。

ギムザ染色の重要な特性として異染性が容易に確認できることがある⁹⁾が、これまではこの所見は乾燥固定ギムザ染色標本で観察可能な所見として周知されてきた。しかし、粘液様物質 (間質性粘液、基底膜様物質、膠原線維状球状物など) や細胞質内顆粒の観察は、湿固定簡易ギムザ染色でも赤紫色に染色され、異染性を示すことが明らかになった。卵巣の明細胞癌の捺印症例において、従来から当院で行っている乾燥固定ギムザ染色とともに湿固定による簡易ギムザ染色を実施したところ、collagenous stroma がいずれの方法でも赤紫色に染色されていることを確認することができた。特に湿固定の場合には厚みのある collagenous stroma が観察され、乾燥固定の場合よりも鮮やかな赤紫色を示して観察可能であった (Photo. 11)。

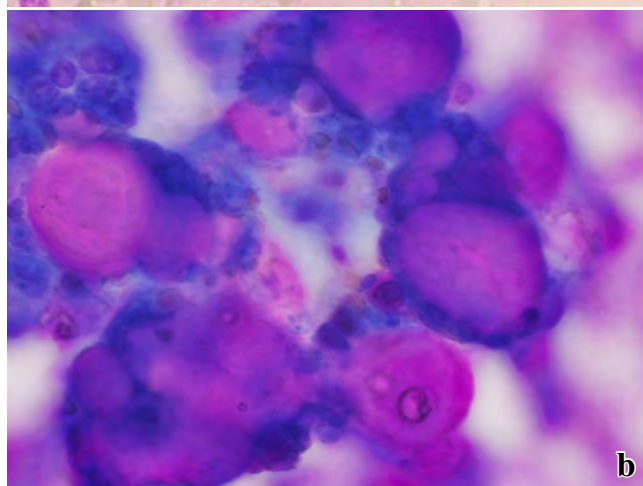
3. その他の利点について

今回の湿固定簡易ギムザ染色の検討において、染色結果以外に特記すべきことが3点ある。一つ目は脱水透徹作業を行わないこと、二つ目は薬液内にホルマリンが含まれていないこと、そして三つ目は感染症対策である。

外来処置室や内視鏡室などでは、患者のすぐそばでの ROSE 作業となることから、薬液臭の防止や毒劇物の使用を避けることは極めて重要である。作業するスタッフに対しても、ドラフトのない場所でのホルマリンやキシレンの作業は、できるかぎり避けなければならない^{14,15)}。採取さ



a



b

Photo. 11 Cytological findings of the collagenous stroma on touch smear cytology in a case of clear cell carcinoma of the ovary.

a : Conventional Giemsa staining with dry fixation, ×40.

b : Simple Giemsa staining with wet fixation, ×40.

れた組織検体をホルマリンに浸漬する作業はどうしても省くことはできないが、最小限に止めたい。その点、本法においては、使用薬液にホルマリンやキシレンは含まれていない。比較として行った超迅速パパンニコロウ染色では、乳腺の乳管癌の生検採取時の捺印標本2例について染色を行ったところ、湿固定簡易ギムザ染色と同様の結果を得た。乾燥固定を行っているため、再水和を行っても細胞の保持が非常によかった。また染色性も良好であった。染色時間も90秒程度と短い。乾燥によってやや細胞が大きくみえるが、これは、好中球などの大きさの対比で対応可能であり、実際に検討を行った標本では違和感なくスクリーニングができた⁵⁾。しかし、再水和後の固定液にホルマリンが含まれていることは、毒劇物への曝露を可能なかぎり避けるという点からは外れることになる。

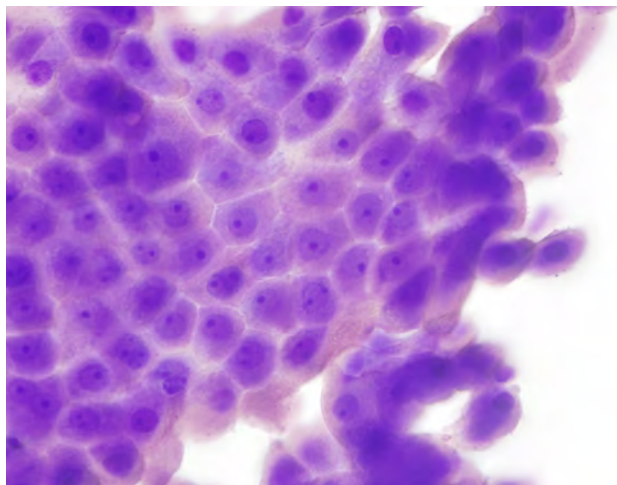


Photo. 12 Cytological findings of apocrine metaplastic cells in needle wash specimens of breast FNAC prepared by the Sure Path method on. Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.

簡易ギムザ染色の染色キットとしてはいくつかの種類が販売されているが、ROSEへの簡易ギムザ染色の導入時に、簡易迅速染色液ディフ・クイック（シスメックス株式会社）、サイトクイック（武藤化学株式会社）を含めた3種類について検討を行った。いずれの染色キットにおいても染色時間は約30秒程度と短く、良好な結果が得られた。その中で、メルク社のヘマカラー迅速染色セットが、当院での通常のルーチンで用いているギムザ染色の色調に最も近似しており、さらに紫色のコントラストが明瞭であることから導入に至った。

従来より、LBC法検体はギムザ染色には適さないといわれてきたが、今回試験的に簡易ギムザ染色を行ったところ、ROSEで検討したさまざまな所見と類似した染色結果が得られた。当院では、FNAC施行時にサイトリッチレッド保存液（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて穿刺針を洗浄し、病理検査室に持ち帰って、BD シュアパス™法によりLBC標本作製している¹⁶⁾。また、EUS-FNAB時に穿刺針内を生理食塩水で洗浄した検体も同様に、サイトリッチレッド保存液を用いてLBC標本作製している。今回、乳腺のFNACと胃粘膜下腫瘍のEUS-FNAB施行時に得られた穿刺針洗浄液で作製したLBC標本で湿固定簡易ギムザ染色を行ったが、細胞形態の観察可能な標本が得られることがわかった（Photo. 12, 13）。このようにLBC標本を用いて、アルシアン青染色と簡易ギムザ染色を併用すれば、より多くの情報が得られ、より確実な診断が可能と考えられる。

ROSEの検体採取における感染症対策として、外来患者の検体には感染症の危険性があることを常に考慮する必要

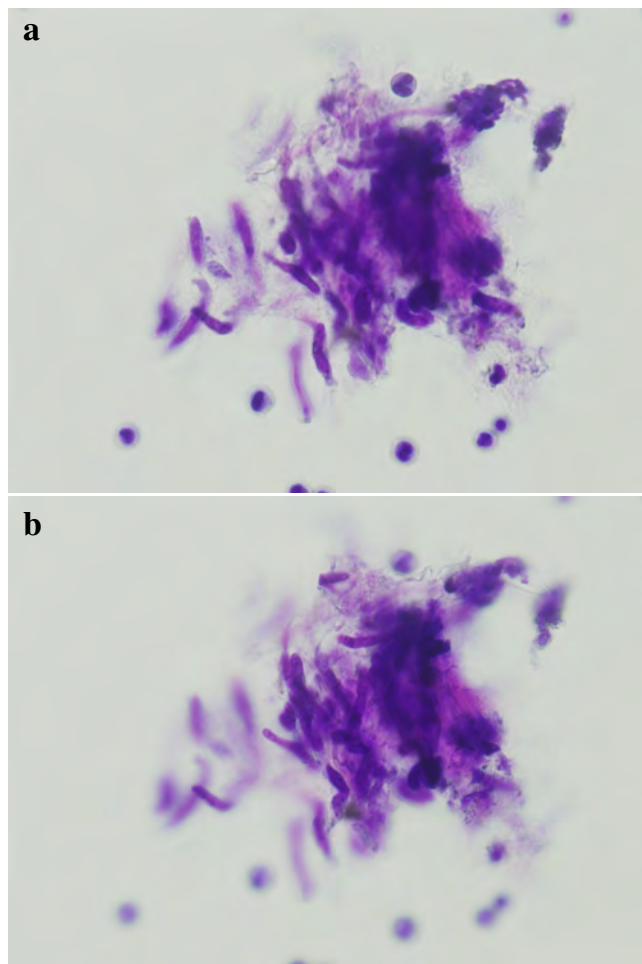


Photo. 13 Cytological findings of gastric GIST cells in needle wash specimens of EUS-FNAB prepared by the Sure Path method. (a) (b) show the same cell cluster at different depths of focus. a, b : Simple Giemsa staining with wet fixation, $\times 40$.

があり、採取された検体の取り扱いには、細心の注意を払わなければならない。乾燥固定検体では病原体の飛散がより起こりやすいことを考えると、エタノールによる湿固定を行う方が安全性が高いと考えられる。固定液として用いるエタノールは消毒用アルコールに比してアルコールの濃度が高く、殺菌・消毒能力は劣る¹⁷⁾。しかし、採取後すぐに液内に浸漬することや、固定液内に入れた状態で外来と検査室間の移動を行うことから、感染防止の効果も高いと考えられる。

V. 結 語

エタノール湿固定による簡易ギムザ染色は、一般的な乾燥固定のギムザ染色で得られるのと同等の情報が得られるだけでなく、パパニコロウ染色につながる細胞所見を得る

ことが可能な染色であり, ROSE に際して臨床側により多くの情報を提供できる可能性があると考えられる。また, 感染症対策としても乾燥固定検体に比して安全性が高いと考えられた。

著者らは, 開示すべき利益相反状態はありません。

本論文の要旨は第60回日本臨床細胞学会総会春期大会(2019年6月, 東京)で発表した。

Abstract

Objective : Rapid on-site cytologic evaluation (ROSE) of fine-needle aspiration cytology (FNAC) specimens and ultrasound-guided endoscopic fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNAB) specimens was carried out not only to prevent degeneration of the obtained cells, but also to conduct quantitative and qualitative evaluation of the collected cells. As a staining method in ROSE, we examined the usefulness of simple Giemsa staining with wet fixation.

Study Design : The cellular morphology in simple Giemsa staining was compared to that in Papanicolaou re-staining after decolorization and refixation of the simple Giemsa-stained samples.

Results : We could easily observe metachromasia of the neuroendocrine granules in tumors with neuroendocrine differentiation, such as breast cancers and pancreatic tumors. The mucus, colloid and stroma in various tissues could also be well evaluated.

Conclusion : The wet fixation made it possible for us to observe the same cells by Papanicolaou re-staining. Moreover, we could obtain much information within a short screening time, and the wet fixation in the present method was considered to be safer in terms of the infection risk from the obtained materials than the dry fixation used in other staining methods. Thus, simple Giemsa staining with wet fixation appears to be very useful for ROSE.

文 献

- 1) Schmidt, R. L., Witt, B. L., Lopez-Calderon, L. E., Layfield, L. J. The influence of rapid onsite evaluation on the adequacy rate of fine-needle aspiration cytology : a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Pathol* 2013 ; 139 : 300-308.
- 2) Tambouret, R. H., Barkan, G. H., Kurtycz, D. F. I., Padmanabhan, V. Cytopathology and More FNA cytology : Rapid on-site

evaluation – how practice varies. 2014.05.14. <https://www.captodayonline.com/fna-cytology-rapid-on-site-evaluation-how-practice-varies/> (Retrieved on January 10, 2020)

- 3) Shorr, E. A New Technic for Staining Vaginal Smears. *Science* 1940 ; 91 : 321-322.
- 4) Yang, G. C. H. Ultrafast Papanicolaou stain : a superior stain for fine-needle aspiration cytology applied in conjunction with the rehydration of air-dried smears by normal saline technique. *Adv Anat Pathol* 1994 ; 2 : 208-211.
- 5) 小林省二. 迅速細胞診断のための ultrafast Papanicolaou 染色法. *検査と技術* 2004 ; 32 : 25-28.
- 6) 林 毅, 小野道洋, 石渡裕俊, 植村尚貴, 萩野次郎, 長谷川匡・ほか. EUS-FNA の最新テクニックと迅速病理診断の実際. *Gastroenterol Endosc* 2015 ; 57 : 54-65.
- 7) Schulte, E. K. W., Wittekind, D. H. A quick and standardized giemsa stain for wet-fixed cytological material. *Stain Technology* 1989 ; 64 : 253-254.
- 8) 3ステップの簡易ギムザ染色迅速染色セット Hemacolor® ヘマカラー. <https://www.sigmaaldrich-jp.com/catalog/download/LEM002> (Retrieved on January 10, 2020)
- 9) 西 国広. ギムザ染色の基礎と応用. *Medical Technology* 2008 ; 36 : 452-458.
- 10) 広川満良. 細胞診におけるギムザ染色の有用性. *診断病理* 2000 ; 17 : 211-218.
- 11) 山口知彦. 細胞診, ギムザ染色用の細胞乾燥はゆっくり行っではダメ! *Medical Technology* 2014 ; 42 : 1445-1448.
- 12) 水口國雄. 最新染色法のすべて. 東京 : 医歯薬出版 ; 2011. 248-249.
- 13) 金井正光. 臨床検査法提要 改訂第34版. 東京 : 金原出版 ; 2015. 1383.
- 14) 日本病理学会. ホルムアルデヒドの健康障害防止について. http://pathology.or.jp/jigyou/pdf/formaldehyde01_080225.pdf. (Retrieved on January 10, 2020)
- 15) 厚生労働省・都道府県労働局・労働基準監督署. 有機溶剤を正しく使いましょう. 2014.08. <https://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/roudou/gyousei/anzen/dl/120815-01.pdf>. (Retrieved on January 10, 2020)
- 16) 山城勝重. BD LBC Reference Book 体腔液編. 東京 : 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 ; 2011. RO-1109-002-496.
- 17) 白石 正, 丘 龍祥, 仲川義人. エタノール, イソプロパノール, メタノール変性アルコール製剤に関する殺菌効力の検討. *環境感染* 1998 ; 13 : 108-112.

症 例

術後に形成された空洞に再発をきたした乳頭状腎細胞癌の1例

橋本 哲也¹⁾ 野並 裕司¹⁾ 金室 俊子¹⁾ 吉田 一彦²⁾
 鬼塚 裕美^{3,4)} 板垣 裕子³⁾ 増井 憲太^{3,4)} 山本 智子^{3,4)}
 澤田 達男^{3,4)} 長嶋 洋治³⁾

東京女子医科大学病院中央検査部病理検査室¹⁾, 同 泌尿器科²⁾, 同 病理診断科³⁾,
 東京女子医科大学病理学 (病態神経科学分野)⁴⁾

背景：乳頭状腎細胞癌 (papillary renal cell carcinoma : PRCC) は、細胞の異型性から type 1 と type 2 に分類される。腎細胞癌の腫瘍細胞が体腔液や術後に形成された空洞に貯留した液中 (術後空洞貯留液) に出現する頻度は低い。今回、腎摘後の術後空洞に再発し、術後空洞貯留液細胞診で陽性を示した PRCC (type 2) を経験したので細胞像を中心に報告する。

症例：50 歳代、男性。透析歴約 8 年。経過観察中の放射線画像で、右腎腫瘍を認めた。腎細胞癌が疑われ、腹腔鏡下腎摘除術が施行された。病理診断は PRCC (type 2) であった。術後約 1 ヶ月、腹膜播種と腰椎転移が疑われ、腎摘後の術後空洞貯留液が、細胞診断のため提出された。標本では、炎症性背景中に、円柱状から類円形、核偏在性、核形不整、核小体肥大、ライトグリーン好性細胞質を有する異型細胞の集塊を認めた。細胞判定は陽性 (positive) であった。体腔液中に出現した場合であれば、腺癌や悪性中皮腫を疑う形態であったが、臨床経過から PRCC の再発を推定した。セルブロック法による免疫細胞化学では、CK7、PAX8 陽性、AMACR、CK20 陰性であった。AMACR 陰性は PRCC として非定型的だが、以上より腎細胞癌の再発を推定した。

結論：術後空洞貯留液中に乳頭状異型細胞がみられた場合、一般的な鑑別である腺癌、悪性中皮腫とともに、臨床像を考慮し、蓋然性の高い組織型の推定が肝要である。

Key words : Papillary renal cell carcinoma, Cytology, Recurrence in the postoperative cavity, Case report

I. はじめに

乳頭状腎細胞癌 (papillary renal cell carcinoma : PRCC) は、腎細胞癌の組織型中、淡明細胞型腎細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma : CCRCC) に次いで多い¹⁾。PRCC は、

腫瘍細胞の異型性から type 1 (核異型度軽度) と type 2 (核異型度高度) に分類される。Type 2 は type 1 に比して予後不良である²⁾。腎細胞癌の腫瘍細胞が体腔液や術後空洞貯留液中に出現する頻度は低い。今回、われわれは腎摘後空洞に再発・腹膜播種をきたした PRCC (type 2) の 1 例を経験したので、術後空洞貯留液中にみられた腫瘍細胞像を報

Papillary renal cell carcinoma with retroperitoneal recurrence and peritoneal dissemination—A with the report of the cytological findings—

Tetsuya HASHIMOTO¹⁾, C. T., I. A. C., Yuji NONAMI¹⁾, C. T., I. A. C., Toshiko KANAMURO¹⁾, C. T., I. A. C., Kazuhiko YOSHIDA²⁾, M. D., Hiromi ONIZUKA^{3,4)}, M. D., Hiroko ITAGAKI³⁾, M. D., Kenta MASUI^{3,4)}, M. D., Tomoko YAMAMOTO^{3,4)}, M. D., Tatsuo SAWADA^{3,4)}, M. D., Yoji NAGASHIMA³⁾, M. D.

¹⁾Laboratory of Pathology, ²⁾Department of Urology, ³⁾Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University Hospital

⁴⁾Department of Pathology, Division of Pathological Neuroscience, Tokyo Women's Medical University

論文別刷請求先 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8 の 1 東京女子医科大学中央検査部病理検査室 橋本哲也

令和 2 年 2 月 26 日受付

令和 2 年 5 月 20 日受理

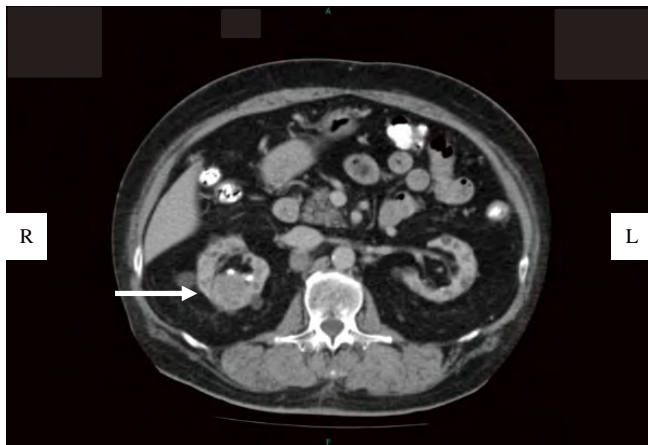


Photo. 1 Findings of CT before the operation.
A mass measuring approximately 40 mm in diameter (arrow) is visualized in the right kidney.

告する。

II. 症 例

50 歳代. 男性.

家族歴：特記すべき事項なし.

既往歴：糖尿病性腎症のため、約 8 年間透析治療.

透析中の経過観察の画像検査で、右腎腫瘍が疑われ、当院紹介となった。CT で右腎上極に腫瘍が認められた (Photo. 1)。腎細胞癌が疑われ、腹腔鏡下腎摘除術が施行された。摘出腎上極、前後面に最大径 50 mm の腫瘍がみられた。病理組織診断は PRCC (type 2) であった。術後 1 ヶ月後に、腰痛を主訴に近医を受診し、CT 検査を施行された。摘除腔周囲に炎症所見を認めたため、当院へ搬送された。CT では術後空洞に貯留液が確認された (Photo. 2a)。さらに、骨盤腔への腹膜播種と L2 椎体転移が疑われた (Photo. 2b, c)。画像上腹膜播種や椎体転移が疑われた病変

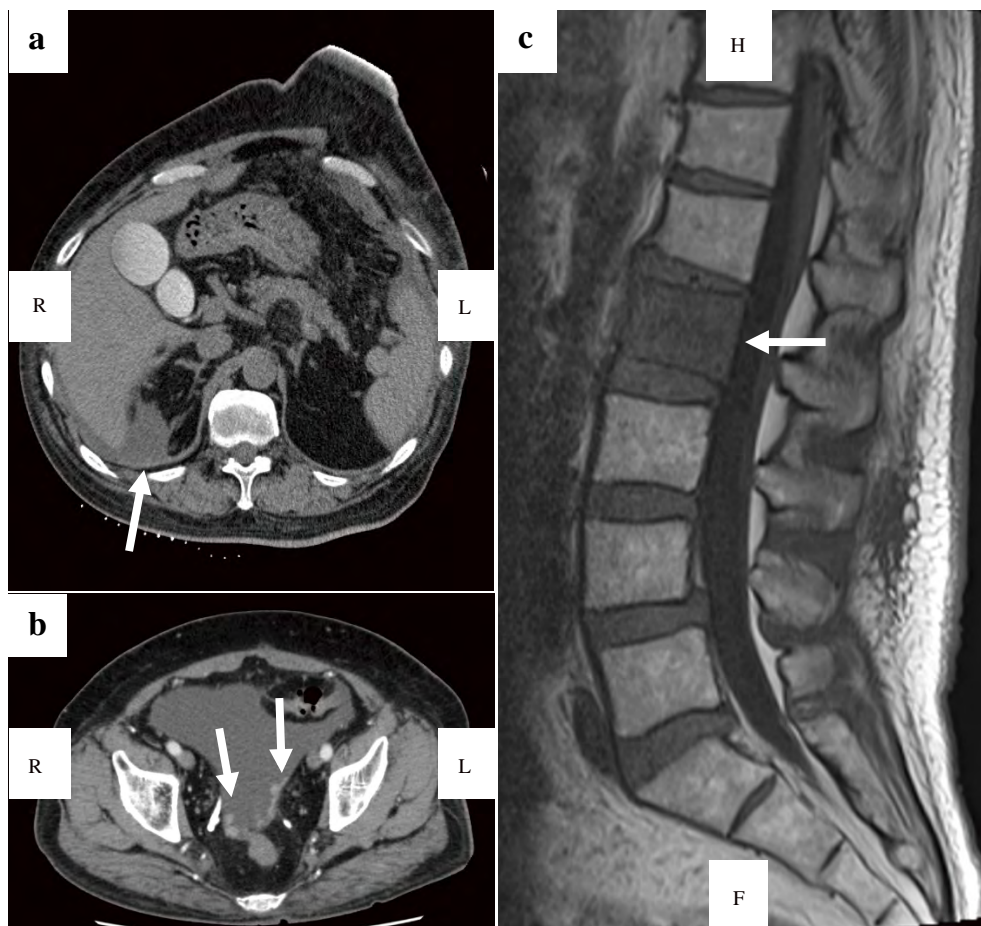


Photo. 2 Findings of CT at recurrence.
Fluid accumulation in the resected cavity after nephrectomy (a : arrow) and pelvic dissemination (b : arrows) are observed. Metastasis was suspected in the second lumbar vertebra (c : arrow).

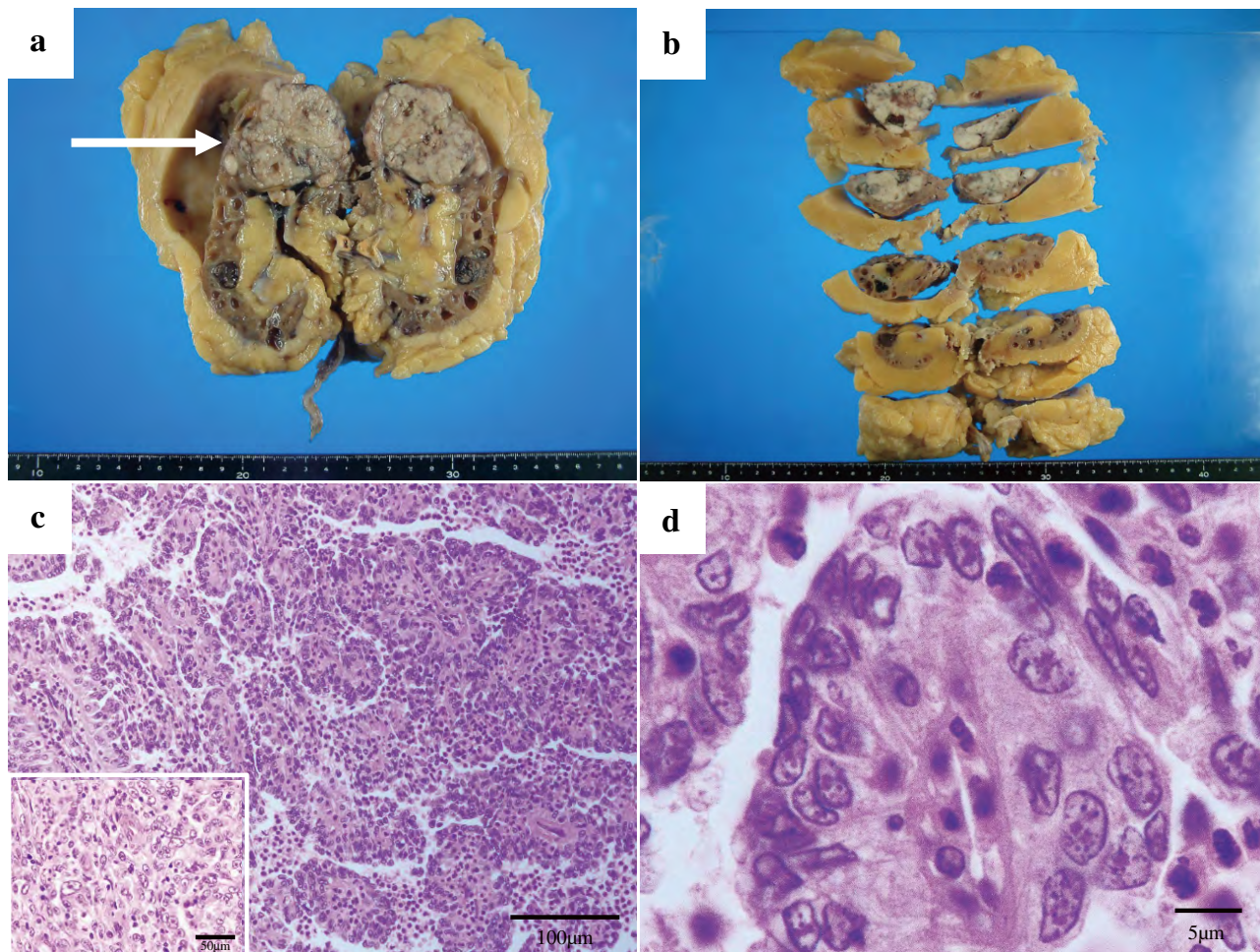


Photo. 3 Macroscopic and histological findings of the tumor in the resected kidney. A brownish mass is found in the upper pole of the right kidney (a, b). Tumor cells with a high nuclear/cytoplasmic ratio arranged in solid sheets and forming papillary structures are seen (c : HE staining, $\times 20$, inset : HE staining, $\times 60$). The tumor cells contain eosinophilic cytoplasm, and irregularly shaped nuclei with prominent nucleoli (d : HE staining, $\times 100$).

部は病理解剖も含めて、検索は実施されていない。術後空洞貯留液の細胞判定結果は陽性 (positive) で、腎細胞癌の再発と推定診断された。患者は緩和ケアを受けていたが、全身状態が悪化し、再発から約3ヵ月後に永眠された。

III. 手術時病理組織所見

右腎摘出検体では、上極に50 mm大の茶褐色調腫瘤を認めた (Photo. 3a, b)。腫瘍は偽被膜を欠き浸潤性に増殖していた。腎洞部脂肪組織浸潤を示し、腎静脈内には腫瘍血栓が形成されていた。

組織学的には、腫瘍は乳頭状構築を呈し、一部充実性であった。腫瘍細胞は大型で、N/C比は高く、核は大型、細胞質は好酸性であった (Photo. 3c, d)。非腫瘍部腎実質では、萎縮した糸球体や尿管、嚢胞形成がみられた。免疫組織化学染色では腫瘍細胞は、cytokeratin 7 (CK7)、

α -methylacyl-CoA racemase (AMACR)、fumarate hydratase (FH)、carbonic anhydrase IX (CAIX) 陽性、E-cadherin 弱陽性、CK20、CD10、transcription factor enhancer 3 (TFE-3)、cathepsin K、CK34 β E12、GATA3 陰性であった。以上より、PRCC (type 2)、pT3a、ly1、v1、G3>G2、Fuhrman Grade 4 と診断した。

IV. 術後空洞貯留液細胞所見

術後空洞貯留液の細胞所見は、炎症性背景に、強い重積と結合性を示す細胞集塊として観察され、乳頭状由来が示唆された (Photo. 4a, b)。本例でみられた異型細胞は、周囲のリンパ球と比較して大きく円柱状から類円形、ライトグリーン好性細胞質を有して核偏在性、核は類円形から楕円形で核形不整と核小体が目立ち、強い核異型を認めた (Photo. 4c)。セルブロック標本においても類似した異型細

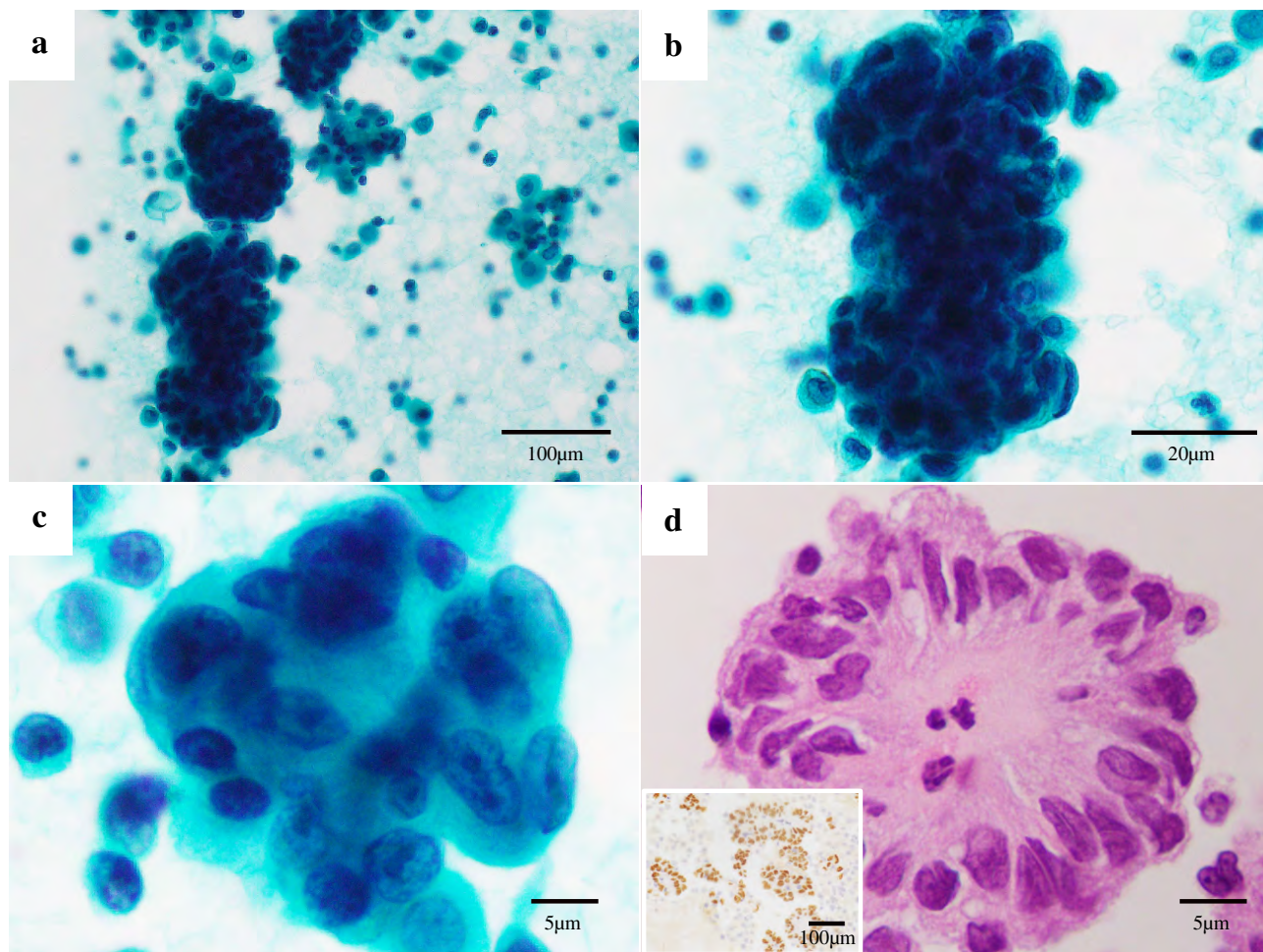


Photo. 4 Cytological findings of the fluid accumulated in the postoperative cavity. Clumps of cells accumulated at a high density in an inflammatory background (a : Papanicolaou staining, $\times 20$; b : Papanicolaou staining, $\times 40$). Atypical cells with large and irregularly shaped nuclei and dense chromatin are observed in both the routine Papanicolaou-stained sections and the cell block preparations (c : Papanicolaou staining, d : Cell block HE staining, $\times 100$). The atypical cells showed positive staining for PAX8 (inset, $\times 20$).

胞がみられた (Photo. 4d)。術後空洞貯留液中に乳頭状腫瘍由来を示唆する異型細胞がみられ PRCC の再発を推定したが、体腔液中に出現した場合は腺癌や悪性中皮腫と鑑別を要する可能性も考えた (Photo. 5)。セルブロック標本を用いた免疫細胞化学染色では、CK7, PAX8 陽性 ; AMACR, CK20 陰性であった。以上の結果を総合して、細胞判定は陽性 (positive)、腎細胞癌の再発と推定診断した。

V. 考 察

病理組織学的に PRCC は、立方状や円柱状の腫瘍細胞が、線維血管性間質を中心に有する乳頭状構造からなる。また、間質に泡沫細胞の集簇がみられ、砂粒体や硝子化を伴うこともある³⁾。Type 1 の特徴は細胞質に乏しい小型腫瘍細胞が単層に増生するのに対し、type 2 は細胞質が豊富

で好酸性、腫瘍細胞は偽重層を示し、核異型が目立つ⁴⁾。

Sidana ら⁵⁾は、PRCC 原発巣での細胞像の特徴として、壊死性背景に泡沫細胞を認め、乳頭状または孤在性に出現し、核は小型でクロマチンは細顆粒状であると報告している。Lim ら⁶⁾は、乳頭状集塊の断片が球状集塊としてみられたと報告している。しかし、癌性腹膜炎を初発症状とする腎細胞癌は少なく、1%以下とされており⁷⁾、体腔液や貯留液などの、液状検体中の細胞像報告も少ない。

本例では、核形不整、著明な核小体肥大などの核異型が顕著で、手術検体にみられた腫瘍細胞形態と類似していた。

PRCC の細胞像の特徴として、乳頭状集塊の形成やヘモジデリンを含有した組織球の出現も報告されているが^{8,9)}、今回の術後空洞貯留液中の細胞像にはそれらが乏しかった。原発充実部分と液状検体中の細胞像には若干の違いを生じる可能性があると思われる。液体に浮遊した状態では

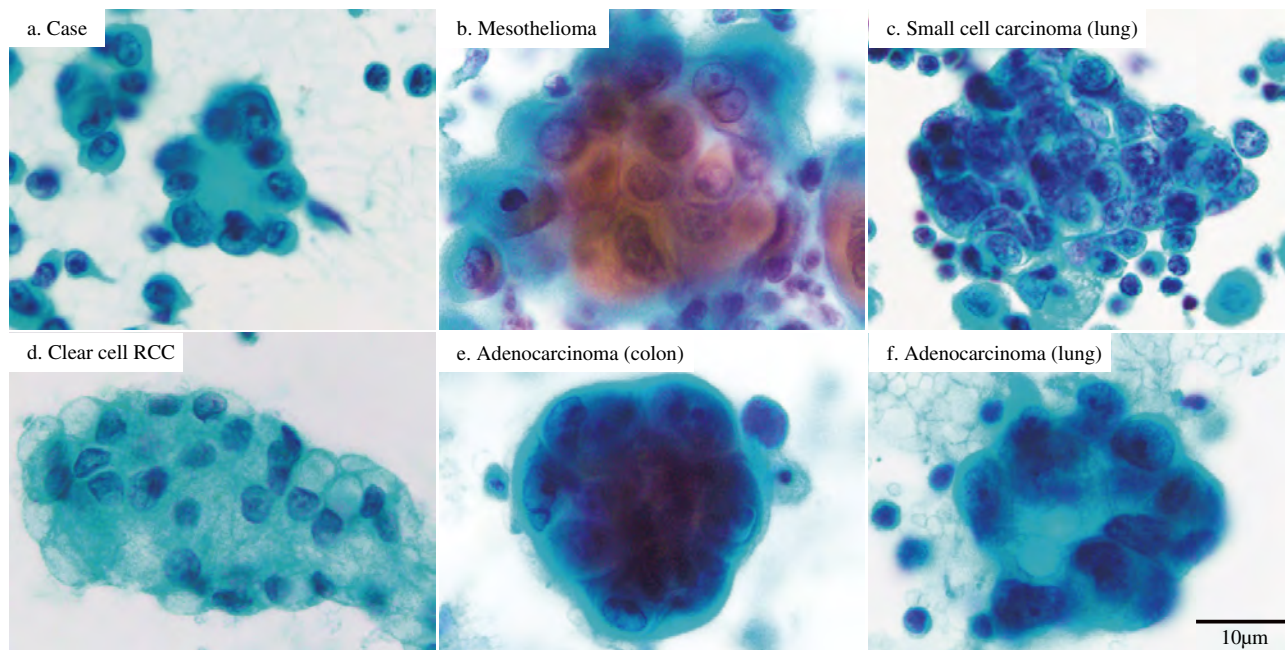


Photo. 5 Cytological findings in our case in comparison with the representative cytological features of several tumors whose cells are commonly found in body cavity fluids (Papanicolaou staining, $\times 100$).

In the present case (a), the thick cytoplasm seen in malignant mesothelioma (b) was not apparent, and the nuclear molding and characteristic salt-and-pepper chromatin pattern found in small cell carcinoma (lung) (c) were not observed. Cells from clear cell RCC show distinct nucleoli with clear and abundant cytoplasm (d), while our case showed different cytoplasmic findings, despite also showing the prominent nucleoli in the irregularly shaped nuclei. On the other hand, in adenocarcinoma of the colon and lung, cells with strong nuclear atypia forming papillary structures are seen, similar to the finding in our case (e, f).

球状形態をとりやすいため¹⁰⁾、本例でみられた重積を伴う細胞集塊は、乳頭状増殖部分が術後空洞貯留液中に遊離したとして矛盾しないと考えられる。

今回、腎摘出時の組織標本とセルブロック標本での免疫細胞化学染色で AMACR の染色結果に乖離がみられたが、手術材料においても一部陰性の部分があったことから、この部分が術後空洞貯留液中に出現した可能性がある。また、細胞変性のため抗原性が失われた可能性も考えられた。

液状検体の細胞診では、CCRCC や小細胞癌などのように特徴的な所見を有する症例との細胞所見や細胞形態による鑑別は比較的容易だが、本例のような乳頭状腫瘍由来を示唆する細胞像を呈する他臓器の腫瘍は少ないため、既往歴などの臨床情報を踏まえ、必要であれば、セルブロック法や細胞転写法での免疫細胞化学染色を併用し、原発臓器や組織型についても検査・診断することが重要と考える。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

本論文の要旨は第 60 回日本臨床細胞学会春期大会 (2019 年 6 月) において発表した。

Abstract

Background : Papillary renal cell carcinoma (PRCC) is the second most common type of RCC after clear cell RCC, and is subclassified into types 1 and 2, according to the degree of nuclear atypia. Since RCC cells rarely appear in body cavity fluids, we report the cytological findings in a case of PRCC (type 2) with retroperitoneal recurrence and peritoneal dissemination.

Case : A man in his 50's who had received maintenance hemodialysis for approximately 8 years was suspected as having a right renal tumor during follow-up. The histologic diagnosis was PRCC (type 2). One month postoperatively, peritoneal dissemination and vertebral metastasis were found. Specimens of the fluid accumulated in the excision cavity were submitted for cytological examination, which revealed clusters of atypical cells in an inflammatory background. The atypical cells contained eosinophilic cytoplasm and irregularly shaped nuclei with prominent nucleoli. The cytological diagnosis was "malignant." Immunocytochemistry using a cell block revealed positive staining of the atypical cells for CK7, PAX8, but a negative staining result for CK20 and AMACR. Based on these findings, the lesion was diagnosed as a recurrence of PRCC.

Conclusion : When papillary clusters of atypical cells are found in a body cavity fluid, the possibility of PRCC should be included in the dif-

ferential diagnosis. Diagnostic procedures including immunocytochemistry are recommended.

文 献

- 1) Delahunt, B., Algaba, F., Eble, J., Cheville, J., Amin, M. B., Argani, P., et al. Papillary renal cell carcinoma. WHO classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon : IARC Press : 2016. 23-25.
- 2) Klatte, T., Pantuck, A. J., Said, J. W., Seligson, D. B., Rao, N. P., LaRochelle, J. C., et al. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2009 ; 15 : 1162-1169.
- 3) 清水道生, 小島史好. I. 腎臓 Papillary renal cell carcinoma. 清水道生, 編. 泌尿器病理診断トレーニング. 東京 : 医学書院 : 2016. 32-34.
- 4) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会, 編. 腎癌取扱い規約第5版. 東京 : メディカルレビュー : 2020. 65.
- 5) Sidana, A., Kadakia, M., Friend, J. C., Krane, L. S., Su, D., Merino, M. J., et al. Determinants and prognostic implications of malignant ascites in metastatic papillary renal cancer. Urol Oncol 2017 ; 35 : 114.e9-114.e14.
- 6) Lim, J. C., Wojcik, E. M. Fine-Needle Aspiration Cytology of papillary renal cell carcinoma : The association with concomitant secondary malignancies. Diagn Cytopathol 2006 ; 34 : 797-800.
- 7) 小森和彦, 山本圭介, 申 勝, 高田 剛, 本田正人, 藤岡秀樹. 癌性腹膜炎による著明な腹水を初発症状とした小腎細胞癌 (径 1.5 cm) の 1 例. 泌尿紀要 2003 ; 49 : 353-355.
- 8) 山口直則, 今村好章, 嶋本知子, 河田尚子, 中山啓三, 安田迪之. 乳頭状腎細胞癌の 2 例. 日臨細胞会誌 1999 ; 38 : 455-461.
- 9) 船越真衣, 石原美佐, 井上友佳里, 清水理絵, 西田 稔, 毛利衣子・ほか. 2 型乳頭状腎細胞癌の 1 例—CT ガイド下腎腫瘍生検時の針先洗浄細胞診を中心に—. 日臨細胞会誌 2019 ; 58 : 120-125.
- 10) 三宅康之, 西 国広, 丸川活司. III 体腔液の細胞診. 西 国広, 基礎から学ぶ 細胞診のすすめ方第 3 版. 東京 : 近代出版 ; 2012. 102.

〈特集〉 甲状腺細胞診——さらなる発展へ向けての展望——

特集によせて

治療開始前に行われる甲状腺穿刺吸引細胞診は、今日では実質的に確定診断の役割を担っている。細胞診の判定結果によって、治療法や患者への対応が決められる。そこには組織診は介在しない。実質臓器の細胞診でこのように組織診を凌駕する診断上の扱いをされているのは甲状腺領域のみである。他の部位にはみられないこの様な大きな診断学的意義を付与されている甲状腺細胞診において、将来展望として何が模索されているのかを本特集ではまとめた。具体的には実際の細胞診のプロセスを追って、検体採取・標本作製・スクリーニング・判定の順に現状と未来像が述べられる。これからの課題としての遺伝子検査にもふれられている。ここでの論考は甲状腺領域に限られてはいるが、他の領域の細胞診でもすくなく参考にしていただければ幸いである。なお、本特集の内容は第61回日本臨床細胞学会総会春期大会（2020年、Web学会）で、同タイトルのシンポジウムとして取り上げられたものである。

坂本穆彦（大森赤十字病院検査部）

廣川満良（隈病院病理診断科）

特集

甲状腺細胞診における穿刺法・塗抹法のコツ

廣川 満良

隈病院病理診断科

穿刺吸引細胞診は簡便、正確、迅速で、経済的な診断法であり、甲状腺結節の診断に広く用いられている。しかし、その高い診断精度を得るためには、穿刺医は十分にトレーニングを受け、豊富な経験を積んでいる必要がある。穿刺法や塗抹法に関して今までに記載されてきた内容は画一的で、実際の現場では臓器、病変、穿刺物の性状や量により適宜最適な方法で臨機応変に行わなければならないため十分とはいええない。穿刺法や塗抹法の向上には、豊富な経験と知識、そして、細胞診標本の観察から得られた情報のフィードバックによる穿刺技術の反省が必須である。筆者は年間3000結節の甲状腺穿刺吸引を行っている細胞診専門医であり、その経験をもとに確立した穿刺法と塗抹法の集大成がこの論文に記載されている。この総説が少しでも多くの細胞専門医がみずから穿刺するきっかけになれば幸いである。

Key words : Thyroid, Fine needle aspiration cytology, Press & release method, Liquid based cytology

I. はじめに

甲状腺穿刺吸引細胞診は診断精度が高く、合併症が少ないことから、結節性病変の鑑別には不可欠な診断法として広く行われている^{1,2)}。その高い診断精度を得るためには、的確に病変部を穿刺し、適切に塗抹することが重要で、診断困難例や誤診例の多くは的を外した穿刺部位や不適切な塗抹によると言っても過言ではない。Ljungらは、十分にトレーニングされた医師が穿刺した場合の悪性の見逃し率は2%、良性結節の切除率は8%であったのに対し、十分なトレーニングを行っていない医師が穿刺した場合の悪性の見逃し率は25%、良性結節の切除率は30%であったと報告している³⁾。甲状腺の穿刺法や塗抹法に関しては今まで多くの報告がある^{2~7)}が、その内容はいずれも画一的である。

実際の現場では臓器、病変、穿刺物の性状や量により適宜最適な方法で臨機応変に行わなければならない。そのためには、十分な経験と知識、そして、細胞診標本の観察から得られた情報のフィードバックによる穿刺技術の反省が必須である。筆者は年間3000結節の甲状腺穿刺吸引を行っている細胞診専門医であり、その経験をもとに確立した穿刺法と塗抹法の集大成をここに述べる。そして、この総説が少しでも多くの細胞専門医がみずから穿刺するきっかけになれば幸いである。

II. 前処置と準備用品

前処置として特別なことはなく、麻酔は通常行わない⁵⁾。抗凝固薬の服用を中止すると穿刺による出血・血腫が起こりにくいと報告もある²⁾が、絶対的禁忌ではなく、当院ではあえて中止する必要はないという方針で行っている。最も重要なのは安全に穿刺を行うことであり、穿刺針を刺入している数秒間は、①動かない、②声を出さない、③嚥下しない、ことを患者に理解してもらい、協力を求める。患者の緊張・不安を極力軽減させる配慮も重要である。Table 1に準備すべきものを示す。超音波装置は必須であり、針先がよく描出できるように設定する必要がある⁸⁾。感染予防には探触子カバーを用いるが、当院ではコンドーム

Thyroid fine needle aspiration cytology—The aspiration and smearing technique—

Mitsuyoshi HIROKAWA, M. D., F. I. A. C.

Department of Diagnostic Pathology and Cytology, Kuma Hospital

論文別刷請求先 〒650-0011 神戸市中央区下山手通8の2の35 隈病院病理診断科 廣川満良

令和2年7月2日受付

令和2年7月14日受理

Table 1 Equipment needed for thyroid fine needle aspiration cytology

Ultrasound apparatus, Probe cover (condom), Ultrasound gel (gelatinous disinfectant)
Needles (18- to 25-gauge), Syringe (10 to 30 ml), Pistol-type holder, Extension tube
Glass slides, Marker pen, Tissue paper (Kleenex)
Fixatives (95% Alcohol, LBC fixative, 10% formalin, air blower)
Washout fluid for chemical measurement
Disinfectants, Sterile absorbent gauze, Adhesive plaster, Bottles for disposal

ムで代用している⁴⁾。穿刺針は本邦では 21 ゲージ (G) や 22 G が一般的に用いられている^{4,9)}。一方、欧米では穿刺針はより細い 23~27 G を用いている施設が多い^{2,5,6)}。粘稠なコロイドや出血性成分が多い嚢胞液を排液する場合はより太い針 (18~21 G) を用いる²⁾。注射器にはピストル型ホルダーを装着して穿刺を行う⁵⁾。針と注射器の間に延長チューブを付けて、二人で穿刺を行う方法もある⁶⁾。無吸引法は、針のみ、もしくは注射器の外筒のみを針に装着して行う方法で、針先の切り取りと毛細管現象により検体を採取する方法である^{5,10,11)}。固定液は 95% アルコールが一般的であるが、スプレー式や滴下式のものも市販されている。LBC 検体用固定液、セルブロック用ホルマリン固定液、風乾用送風器なども必要に応じ用意する。穿刺物を用いた生化学検査を行う場合は針洗浄液として生理的食塩水 (0.5~1.0 ml) を用意する¹²⁾。

III. 穿刺の実際

1) 患者の体勢

患者の前頸部をできる限り伸展させることが重要である。それにより、①甲状腺が動きにくくなり、結節が固定されやすい、②皮膚から結節までの距離が短くなる、③下極側に位置する結節が上方に移動し、穿刺しやすくなる、④頸部前の空間が広がり、穿刺操作がしやすくなる、などの利点がある。ベッド使用の際は仰臥位にし、頸部から肩背部に枕を入れる。椅子の際は天井を見上げやすいようにヘッドレストを調整する。一般的には甲状腺穿刺吸引はベッド上にて仰向け状態で行う施設が多いが、当院では超音波画像と患者の頸部の両方が注視しやすい坐位で行っている⁴⁾ (Photo. 1)。

2) 消毒

刺入部と探触子カバー (市販のコンドーム) を消毒する。ゲル状消毒剤は、粘度があり、乾燥も遅めなので、それを用いるとエコーゼリーを使用する必要がない。通常、局所麻酔は行わない⁹⁾が、小児の場合には鎮静剤を投与することもある。麻酔を行わないメリットの一つとして、過剰な痛みや放散痛が神経鞘腫の診断の鍵になることが挙げられ



Photo. 1 Fine needle aspiration cytology is performed with the subject in the seated position.

る⁵⁾。

3) 穿刺部位の選択

診断に最適な部位を穿刺する⁷⁾。動静脈・気管・反回神経などを避けて安全に穿刺するために、必ず超音波ガイド下で行う。充実部と嚢胞部が混在する場合は充実部もしくは充実部と嚢胞部の両方を、nodule in nodule あるいは nodule from nodule の場合はそれぞれの部位を穿刺する。卵殻状石灰化を伴う結節の場合は石灰化層の薄い部から刺入を試みるとよい。石灰化結節の周辺に低エコー帯が広がっている場合は低エコー部も、悪性リンパ腫疑いの場合は結節の中心部を、未分化癌疑いの場合は辺縁部あるいはドブラで血流のある部を穿刺する。

4) 穿刺方向

針の刺入方向には交叉法と平行法 (Fig. 1) がある。交叉

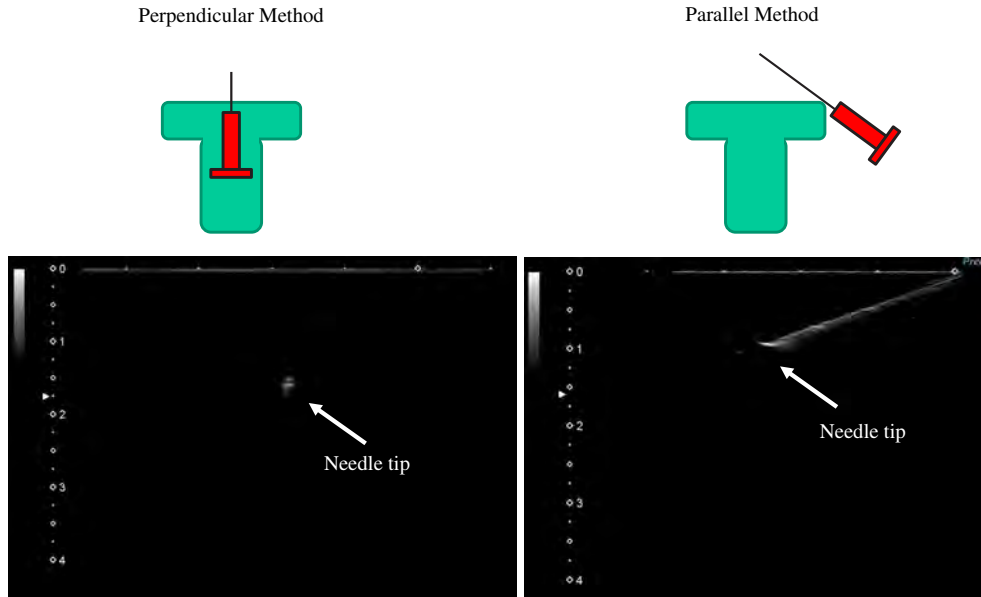


Fig. 1 Two routes of needle insertion, perpendicular and parallel methods.

法は針先が超音波スライス内の領域に入るまでみえないので、ある程度経験が必要であるが、安全で、硬い結節の穿刺も可能である。また、最短距離（多くの場合 2 cm 以内）で目的とする位置に針先を刺入できることから、針が湾曲しにくいし、通常の注射針が使用できる。平行法では針先を常に観察できるが、死角や穿刺ができない部位が生じる。

5) 穿刺手順 (Fig. 2)

(1) 固定：まず、目的とする結節がなるべく動かないように固定することが非常に重要である。そのために、患者にはできる限り前頸部の皮膚を伸展してもらい、プローブで強く結節を圧排する。これにより、結節内の血流量が減少し、内圧が上昇し、細胞が採取しやすくなる。交叉法ではプローブで結節を斜め下から強めに圧排し、針を皮膚に対して垂直に刺入できるようにする。

(2) 刺入：注射針を腫瘍内に差し込み、超音波で針先が腫瘍内にあることを必ず確認する。

(3) 陰圧：わずかに陰圧をかける。陰圧の程度は 0.3 ml 以下で十分である⁴⁾。陰圧をかけなくてもよい。陰圧をかけすぎると、多量の血液を吸引し、検体中の細胞量の割合が減少し、結果的に検体不適正になりやすい。下記の切り取り操作中は、陰圧は一定に保ち、陰圧をかけたり戻したりしてはいけない⁵⁾。

(4) 切り取り：一定の陰圧状態のまま、針を前後にすばやく（1秒間に3回程度）動かす（ピストン運動）か、針先を回転させる。この動きは材料を採取するのに非常に重要で、陰圧ではなく、針先での切り取り操作により組織を採取すると理解すべきである。ピストン運動が速ければ速

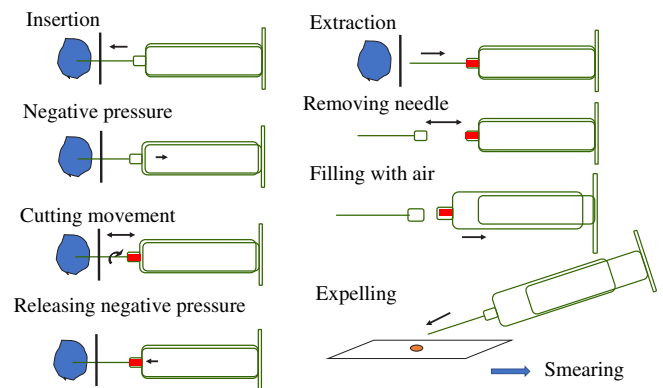
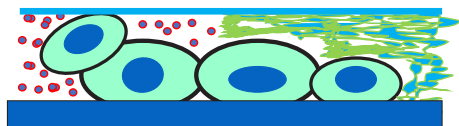


Fig. 2 Aspiration procedures.

いほど採取細胞量は多くなる。ピストン運動をする際、他臓器では方向を変えることが推奨されているが、甲状腺では出血を招きやすいのでしないほうがよい。また、針先が結節外に出ないように注意する。切り取り時間は 3 秒以内に留める³⁾。切り取り時間を長くしても、細胞ではなく、血液を吸引するだけである。採取する検体量は針内の容量で十分である。採取した検体が針基（ハブ）内にみえた場合や血液が採取された場合はただちに切り取り操作を中止する。ただし、嚢胞液の場合は十分に陰圧をかけ、切り取り操作をせずに、シリンダー内にまで吸引する。嚢胞液が粘稠な場合は、嚢胞内容の 10% 程度の量の 95% アルコールあるいは生理食塩水を吸引前に注入してから吸引する方法もある²⁾。

(5) 抜去：針を抜去する前に必ず陰圧を解除する。陰圧状態のまま抜去すると、採取材料がシリンジ内に移動して

Thin preparation



Thick preparation

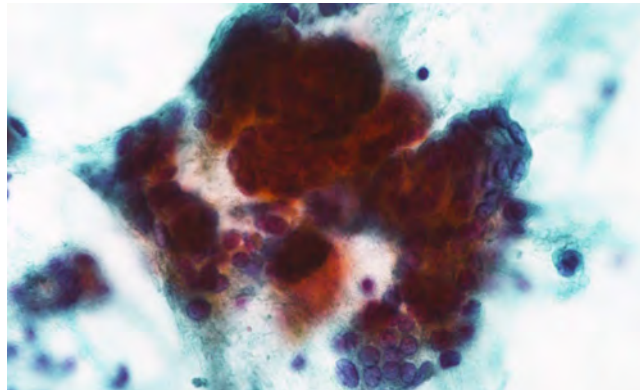
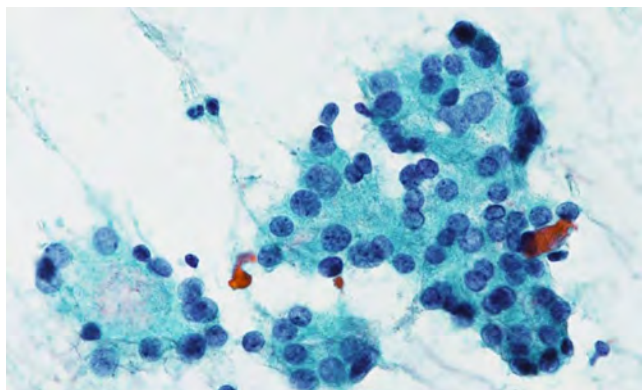
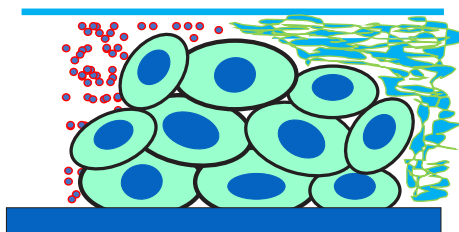


Fig. 3 Difference between thin and thick preparations. Thin preparation is more suitable for the observation of cells than thick one.

乾燥変性を起こすし、取り出しにくくなる。

(6) 排出：穿刺針を注射筒から外し、注射筒に空気を入れてから再び穿刺針を装着し、検体をスライドガラス上に1回で吹き出す。針基やシリンダー内に吸引内容物が入り込んだ場合には排出後にLBC固定液で洗浄したものも検体とする。

(7) 圧迫：穿刺後、刺入部を清潔なガーゼや絆創膏の上から圧迫する。穿刺後の出血は通常数分の圧迫で抑えることができる⁵⁾。当院では15分間、抗凝固薬を服用している場合は20分間圧迫し、止血確認を行っている。

IV. 塗 抹

細胞がスライドガラス上に塗抹されていても、細胞数が少ない場合、変性している場合、細胞が鮮明に観察できない場合などでは、意義不明あるいは検体不適正と報告せざるをえない^{13,14)}。特に甲状腺では血液の混入が起こりやすく、血液に埋もれた細胞は観察の対象外となることが多い。正確で信頼性の高い診断をするためには、できるかぎり観察しやすい標本作製することが重要である。そのため、①薄く塗抹する、②構築を残す、③血液を排除する、④細胞量を確保する、この四つを心掛けて塗抹する。実際には、半固形状、粘稠、液状、出血性、泥状、ゼリー状、ハチミツ状などさまざまな性状の検体が採取されるので、採取した検体の性状や量を鑑み、それぞれに最適な方

法で塗抹すべきである。

1) 合わせ法

半固形物、粘稠な液状検体、少量の液状検体の場合、検体を2枚のスライドガラスで挟み、そのまま上下に離す (press and release method)⁴⁾。検体が厚く塗抹された場合には、スライドガラスの残りの部分を使って再度合わせ法を行う。この方法は細胞の破壊が少なく、組織構築が保たれやすいので、細胞所見と組織構築の両方の観察に適している。

2) 圧挫法

基本的には合わせ法であるが、組織片が採取された場合、検体を2枚のスライドガラスで挟み、圧を加えて組織片を圧挫してから上下に離す。圧を加えずに合わせ法を行うと、厚みのある標本になり、細胞が血液やコロイドにマスクされ、細胞の詳細な観察ができない。特に強拡大での観察は困難を極める (Fig. 3)。

3) 吹き付け法

採取細胞量がわずかな場合、乾燥変性を防ぐため、検体をスライドガラスに吹き出した後、何もせずただちに固定する。

4) 血液除去法

少量の血液が塗抹された場合は、スライドガラスを合わせる時間を長めにすると、血液成分は辺縁に押しやられ、細胞成分が塗抹されている中心部から血液成分が排除され、見やすい標本となる (Photo. 2)。一方、末梢血が大量

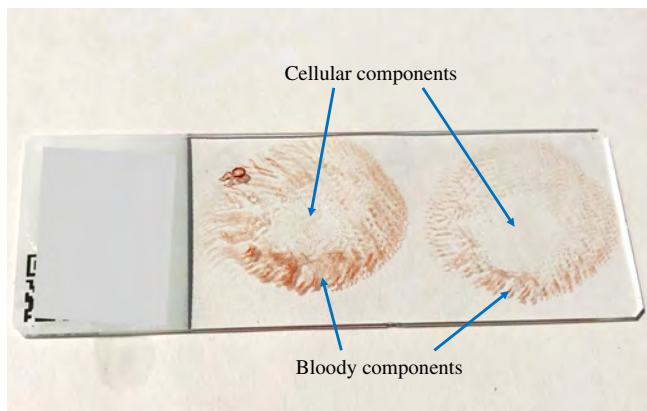


Photo. 2 The press and release method is adopted for preparation of the smear: the bloody components are displaced to the periphery, while the cellular components remain at the originally smeared site.

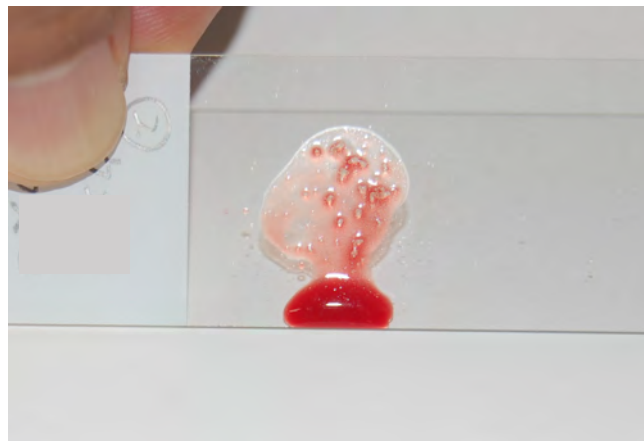


Photo. 3 When the samples are bloody, the bloody component is removed by tilting the glass slide.

に混入した場合、ただちにスライドガラスを斜めあるいは垂直にし、血液成分を下方へ流し落とす (Photo. 3)。細胞成分の多くは最初に塗抹された部分に顆粒状の物質として確認できるので、流れ落ちた血液成分をティッシュペーパーで拭き取った後、合わせ法を行う。

5) 液状化検体法 (liquid-based cytology: LBC)

嚢胞液を吸引した場合、細胞量が少ないと判断した場合、末梢血が混入した場合には、塗抹標本作製せずに、検体をそのまま LBC 固定液に入れる (LBC 単独法)。塗抹後の針を LBC 固定液で洗浄し、通常塗抹標本と併用してもよい (通常塗抹・LBC 併用法)。LBC 固定液は溶血作用・タンパク分解作用のあるものが推奨される。LBC 標本は通常塗抹標本と比べて、細胞の回収率がよく、炎症細胞よりも上皮性細胞が、良性細胞よりも悪性細胞がより優先的に塗抹され、血液やコロイドのないクリーンな背景を特徴とする^{15,16)}。

V. 固 定

95%アルコール、スプレー式固定液、あるいは滴下式固定液などによる湿固定が一般的に行われる。一般的には、固定は塗抹後ただちに行うことが望ましいとされている。しかし、液状検体の場合は、塗抹後すぐに固定液に入れると、せっかく採取した細胞のほとんどはスライドガラスに付着せず固定液の中流れ出て、検体不適正と判断されることになる。したがって、粘度の低い液状検体の場合は、塗抹後10~30秒ほど自然乾燥し、検体の粘度を上げてから固定するとよい。この間、細胞は穿刺液の中に浮遊しているため変性することはない。ギムザ染色を行う場合は、風を当てて乾燥させる (乾燥固定法)。

VI. 補 助 診 断

1) 生化学検査

塗抹後、穿刺針を生食 (0.5~1.0 ml) で洗浄し、その洗浄液を検体として、あるいは、液状検体の場合は穿刺液そのものを検体として、遠心分離後上清を血清と同じ方法で測定する。高分化甲状腺癌の他臓器転移巣、あるいはリンパ節転移が疑われる場合はサイログロブリンを測定する。ただし、中央区域リンパ節の場合は穿刺ルート上に甲状腺組織があることがあるので推奨されない。髄様癌を疑う場合はカルシトニン測定する。副甲状腺病変を疑う場合は副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone: PTH) を測定する。いずれも細胞診より感度が高いとされているが、その適応・評価には注意が必要である¹²⁾。無色透明な液体が採取された場合は副甲状腺嚢胞であり、その検体には細胞はまず含まれておらず細胞診では診断できないため、必ず PTH を測定すべきである。

2) フローサイトメトリー

甲状腺リンパ腫はほとんどが B 細胞性であることから、その細胞膜に発現している κ 鎖ないし λ 鎖をフローサイトメトリーで検出し、免疫グロブリン軽鎖の偏りを判定することにより、モノクロナリティを推定することが可能である¹⁷⁾。軽鎖の偏りが3倍以上を陽性とした場合の感度は73.7%であり、その精度は手術材料を用いた CD45 ゲーティング検査と差がないと報告されている¹⁸⁾。

3) 遺伝子検査

本邦ではいまだ遺伝子検査は日常診断では取り入れられていない。欧米では市販の遺伝子検索システム (ThyroSeq v3, ThyGeNEXT/ThyraMIR, Afirma Gene Sequencing

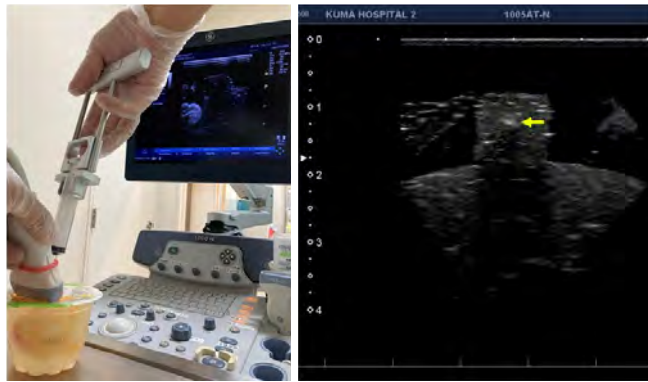


Photo. 4 Training for fine needle aspiration using a cup jelly containing fruits. Arrow indicates needle tip.

Classifier など) を用いて実際に行われており、意義不明の異型および濾胞性腫瘍の診断カテゴリーに対して遺伝子検査を行い、遺伝子異常があるものを手術適応としている^{19~23)}。

VII. 細胞診専門医による穿刺のメリット

今までの臨床教育の基本は、まずは実際の技能を見て覚え、みずから体験して覚え、それを誰かに教えることによって理解を深めるという考え方 (“See one, Do one, Teach one”) であった。最近ではこれに、“Simulate one” と “Reflect one” が加わり、実践前にシミュレーションすること、実践後に振り返って反省し新たな学びにすることが重要とされている (“See one, Simulate one, Do one, Reflect one, Teach one”)。穿刺吸引のシミュレーションには、ファントムを用いる方法²⁴⁾や学会が行っているハンズオンセミナーへの参加がある。筆者が穿刺吸引を始めた時は煮豆を鶏肉や蒟蒻に埋め込んで練習したものだが、カップゼリーを用いれば簡単に練習できるのでぜひ試していただきたい (Photo. 4)。穿刺し、標本を観察し、その反省点を次の穿刺にフィードバックする “Reflect one” は穿刺技術を向上させるのに最も有効な手段である。つまり、診断しやすい理想的な標本を作製するためには細胞診専門医が穿刺すべきなのである²⁵⁾。上記に述べた穿刺法や塗抹法のコツは当院にて細胞診専門医が穿刺することにより編み出された成果の一端である。当院ではゼリー状の検体は100%良性であるので穿刺は1回のみで終了する、合わせ法に用いたスライドガラスを観察しても診断精度の向上に寄与しないため塗抹時に破棄する、などのやり方も標本観察の分析から考え出されたものである。また、硬い石灰化結節の内部に針を刺入できず、周囲の慢性甲状腺炎部から検体を採取した場合、穿刺医と報告医が同一であれば、的確

なコメントを記載することが可能であるが、その情報が知らされていないと的外れな慢性甲状腺炎という報告がなされることになるだろう。最近では、検体不適正を減少させる目的で、細胞検査士が穿刺の場ですぐに染色し採取材料の評価を行う迅速細胞診 (rapid on-site cytologic evaluation ; ROSE) が推奨されている^{11,26)}。

VIII. おわりに

穿刺吸引細胞診は、十分にトレーニングを受けた穿刺医によって行われた場合には非常に診断精度がよく、信頼される診断法といえる。一方、十分なトレーニングを受けていない穿刺医が行った場合は、しばしば誤診やトラブルを招くことになるだろう。穿刺法や塗抹法に関する多くの記載があるものの、臓器、病変、穿刺物の性状や量により適宜最適な方法を選択することが重要である。穿刺法や塗抹法の向上には豊富な経験と知識、そして、標本観察からのフィードバックによる反省が必須である。この総説が少しでも多くの細胞専門医がみずから穿刺するきっかけになれば幸いである。

著者には開示すべき利益相反状態はない。

Abstract

As fine needle aspiration (FNA) is a simple, accurate, fast, and economical diagnostic tool, it is widely used for the diagnosis of thyroid nodules. To obtain high diagnostic accuracy, FNA should be performed by persons with adequate training and experience. I have performed FNA for approximately 3000 thyroid nodules annually. Here, I present the aspiration and smearing techniques for thyroid nodules based on my experience. I conclude that cytopathologists can produce high-quality FNA materials because they can directly correlate the FNA techniques with the microscopic findings. I hope that this article serves as a trigger for cytopathologists to start performing FNA.

文 献

- Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer : The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016 ; 26 : 1-133.
- Gharib, H., Papini, E., Garber, J. R., Duick, D. S., Harrell, R. M., Hegedüs, L., et al. AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid

- Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules-2016 update. *Endocr Pract* 2016 ; 22 : 622-639.
- 3) Ljung, B. M., Drejet, A., Chiampi, N., Jeffrey, J., Goodson, W. H. 3rd, Chew, K., et al. Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration biopsy is determined by physician training in sampling technique. *Cancer Cytopathol* 2001 ; 93 : 263-268.
 - 4) Hirokawa, M., Suzuki, A., Miyauchi, A. Thyroid Fine-Needle Aspiration and Smearing Techniques. *VideoEndocrinology* 2018 7 ; 5 (2) : ve.2018.0119. doi : 10.1089/ve.2018.0119.
 - 5) Wu, M., Burstein, D. E. Fine needle aspiration. *Cancer Invest* 2004 ; 22 : 620-628.
 - 6) Baloch, Z. W., Cibas, E. S., Clark, D. P., Layfield, L. J., Ljung, B. M., Pitman, M. B., et al. The National Cancer Institute Thyroid fine needle aspiration state of the science conference : a summation. *Cytojournal* 2008 ; 5 : 6. doi : 10.1186/1742-6413-5-6.
 - 7) 柳瀬友佳里, 廣川満良, 前川観世子, 隈 晴二, 網野信行, 中村靖司・ほか. 甲状腺穿刺吸引細胞診における検体採取と塗抹法の精度管理. *日臨細胞会誌* 2010 ; 49 : 431-436.
 - 8) 廣川満良. 超音波や CT ガイド下穿刺吸引細胞診. *病理と臨* 2013 ; 31 : 124-128.
 - 9) Tanaka, A., Hirokawa, M., Higuchi, M., Kanematsu, R., Suzuki, A., Kuma, S., et al. Optimal needle size for thyroid fine needle aspiration cytology. *Endocr J* 2019 ; 66 : 143-147.
 - 10) Buzdugă, C. M., Găleşanu, C., Vulpoi, C., Preda, C., Ungureanu, M. C., Ciobanu, D., et al. Thyroid fine-needle biopsy : aspiration versus capillary. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2015 ; 119 : 45-50.
 - 11) Ceresini, G., Corcione, L., Morganti, S., Milli, B., Bertone, L., Prampolini, R., et al. Ultrasound-guided fine-needle capillary biopsy of thyroid nodules, coupled with on-site cytologic review, improves results. *Thyroid* 2004 ; 14 : 385-389.
 - 12) 廣川満良, 鈴木彩葉, 川木裕子, 工藤 工, 木原 実, 宮 章博・ほか. 甲状腺穿刺材料を利用した補助診断. *内分泌外会誌* 2020 ; 37 : 32-38.
 - 13) Cibas, E. S., Ali, S. Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2017 ; 27 : 1341-1346.
 - 14) 日本内分泌外科学会・日本甲状腺病理学会, 編. 甲状腺癌取扱い規約第8版. 東京 : 金原出版 ; 2019.
 - 15) 鈴木彩葉, 廣川満良, 宮内 昭. 甲状腺における液状化検体細胞診. *内分泌甲状腺外会誌* 2014 ; 31 : 120-124.
 - 16) Suzuki, A., Hirokawa, M., Higuchi, M., Yamao, N., Kuma, S., Nakamura, H., et al. Cytological characteristics of papillary thyroid carcinoma on LBC specimens, compared with conventional specimens. *Diagn Cytopathol* 2015 ; 43 : 108-113.
 - 17) Hirokawa, M., Kudo, T., Ota, H., Suzuki, A., Kobayashi, K., Miyauchi, A. Preoperative diagnostic algorithm of primary thyroid lymphoma using ultrasound, aspiration cytology, and flow cytometry. *Endocr J* 2017 ; 64 : 859-865.
 - 18) Suzuki, A., Hirokawa, M., Higashiyama, T., Fukata, S., Takada, N., Hayashi, T., et al. Flow cytometric, gene rearrangement, and karyotypic analyses of 110 cases of primary thyroid lymphoma : a single-institutional experience in Japan. *Endocr J* 2019 ; 66 : 1083-1091.
 - 19) Vargas-Salas, S., Martínez, J. R., Urra, S., Domínguez, J. M., Mena, N., Uslar, T., et al. Genetic testing for indeterminate thyroid cytology : review and meta-analysis. *Endocr Relat Cancer* 2018 ; 25 : R163-R177.
 - 20) Sahli, Z. T., Smith, P. W., Umbricht, C. B., Zeiger, M. A. Preoperative Molecular Markers in Thyroid Nodules. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018 ; 9 : 179.
 - 21) Nikiforov, Y. E., Carty, S. E., Chiosea, S. I., Coyne, C., Duvvuri, U., Ferris, R. L., et al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid* 2015 ; 25 : 1217-1223.
 - 22) Steward, D. L., Carty, S. E., Sippel, R. S., Yang, S. P., Sosa, J. A., Sipos, J. A., et al. Performance of a Multigene Genomic Classifier in Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology : A Prospective Blinded Multicenter Study. *JAMA Oncol* 2019 ; 5 : 204-212.
 - 23) Otori, N. P., Landau, M. S., Carty, S. E., Yip, L., LeBeau, S. O., Manroa, P., et al. Benign call rate and molecular test result distribution of ThyroSeq v3. *Cancer Cytopathol* 2019, 127 (3) : 161-168, doi : 10.1002/cncy.22088.
 - 24) Baba, M., Matsumoto, K., Yamasaki, N., Shindo, H., Yano, H., Matsumoto, M. et al. Development of a Tailored Thyroid Gland Phantom for Fine-Needle Aspiration Cytology by Three-Dimensional Printing. *J Surg Edu* 2017 ; 74 : 1039-1046.
 - 25) Werga, P., Wallin, G., Skoog, L., Hamberger, B. Expanding role of fine-needle aspiration cytology in thyroid diagnosis and management. *World J Surg* 2000 ; 24 : 907-912.
 - 26) Pastorello, R. G., Destefani, C., Pinto, P. H., Credidio, C. H., Reis, R. X., Rodrigues, T. A., et al. The impact of rapid on-site evaluation on thyroid fine-needle aspiration biopsy : A 2-year cancer center institutional experience. *Cancer Cytopathol* 2018 ; 126 : 846-852.

甲状腺領域における LBC 検体の有効活用

山谷 幸恵

福島県立医科大学医学部甲状腺内分泌学講座

甲状腺領域での細胞診は、質的診断の精度が針生検組織診と同様であることから確定診断として用いられることが多い。甲状腺領域の liquid-based cytology (LBC) は、採取細胞量の回収率が高く、検体不適正率が減少することが最大の利点である。LBC 検体からの免疫染色により診断精度が向上し再検査の回避や、遺伝子検査を行うことでより治療に直結した診断が行える。

Key words : LBC (liquid-based cytology), Thyroid, Immunocytochemistry

I. はじめに

甲状腺領域において、従来の直接塗抹法では、血液混入、乾燥などにより検体不適正となることもしばしばあり、穿刺や標本作成における手技が検体不適正率に影響する。LBC (liquid-based cytology) は、2007 年に提唱された甲状腺細胞診ベセスダシステム(第 1 版)にも採用されている。標本作製時などの手技の影響を受けず、精度の高い標本作製が可能で、採取細胞量の回収率が高い。そのため、検体の不適正率が減少し、精度管理上も有用であるとの報告が近年増加し、本邦でも導入する施設が増えてきた^{1~4)}。

また、甲状腺領域での細胞診は、病変の質的診断の精度が針生検組織診と同様とされ⁵⁾、侵襲性が低いなどの理由から、診断・治療方針の決定までを担っている。確定診断にいたらなかった場合には再検査が行われることが多いが、LBC 検体では、免疫染色や遺伝子検索についても応用可能であり^{6~9)}、再検査を回避し確定診断にいたれる可能性もある。

II. LBC の原理・特徴

LBC には、フィルターを用い細胞が均一に平面的に塗抹されるフィルター転写法と、重力による自然沈下で塗抹され、立体的な細胞像が得られる細胞沈下法がある。

フィルター転写法には ThinPrep[®] 法 (Hologic)、Cell-prep[®] 法 (Roche)、遠心沈降法には CytoRich[™] 法 (BD)、TACAS[™] 法 (MBL)、LBC PREP[™] 法 (武藤化学) などがある。

それぞれ、長所・短所があり、LBC 法の果たす役割が異なるため、その目的に応じた方法を選択する¹⁰⁾。

ここでは、甲状腺疾患で導入経験のあるサイトリッチレッドを使用した CytoRich[™] 法 (BD) について解説する。

CytoRich[™] 法で使用する保存液には、サイトリッチブルー保存液と、サイトリッチレッド保存液がある。サイトリッチレッド保存液は、約 30% がアルコール成分で、ほかにホルムアルデヒド、エチレングリコールを含んでいる。溶血作用やタンパク可溶化作用があり、背景がきれいなため、血液混入の多い甲状腺領域では有用である。一方、サイトリッチブルー保存液は、エタノールとメタノールなどからなり、溶血作用やタンパク可溶化作用を有さない。

細胞所見は、従来法と異なるため注意が必要である。細胞沈下法であるため、細胞構築が保たれたまま標本となるため、乳頭状集塊や濾胞構造が立体的に観察できる。一方、大型集塊では、塗抹が厚くなるため、集塊を構成している個々の細胞の観察が困難な場合もある。背景のコロイド・

Effective utilization of liquid-based cytology for thyroid lesions

Yukie YAMAYA, C. T., I. A. C.

Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University School of Medicine

論文別刷請求先 〒960-1295 福島県福島市光が丘1 福島県立医科大学医学部甲状腺内分泌学講座 山谷幸恵

令和2年7月27日受付

令和2年8月19日受理

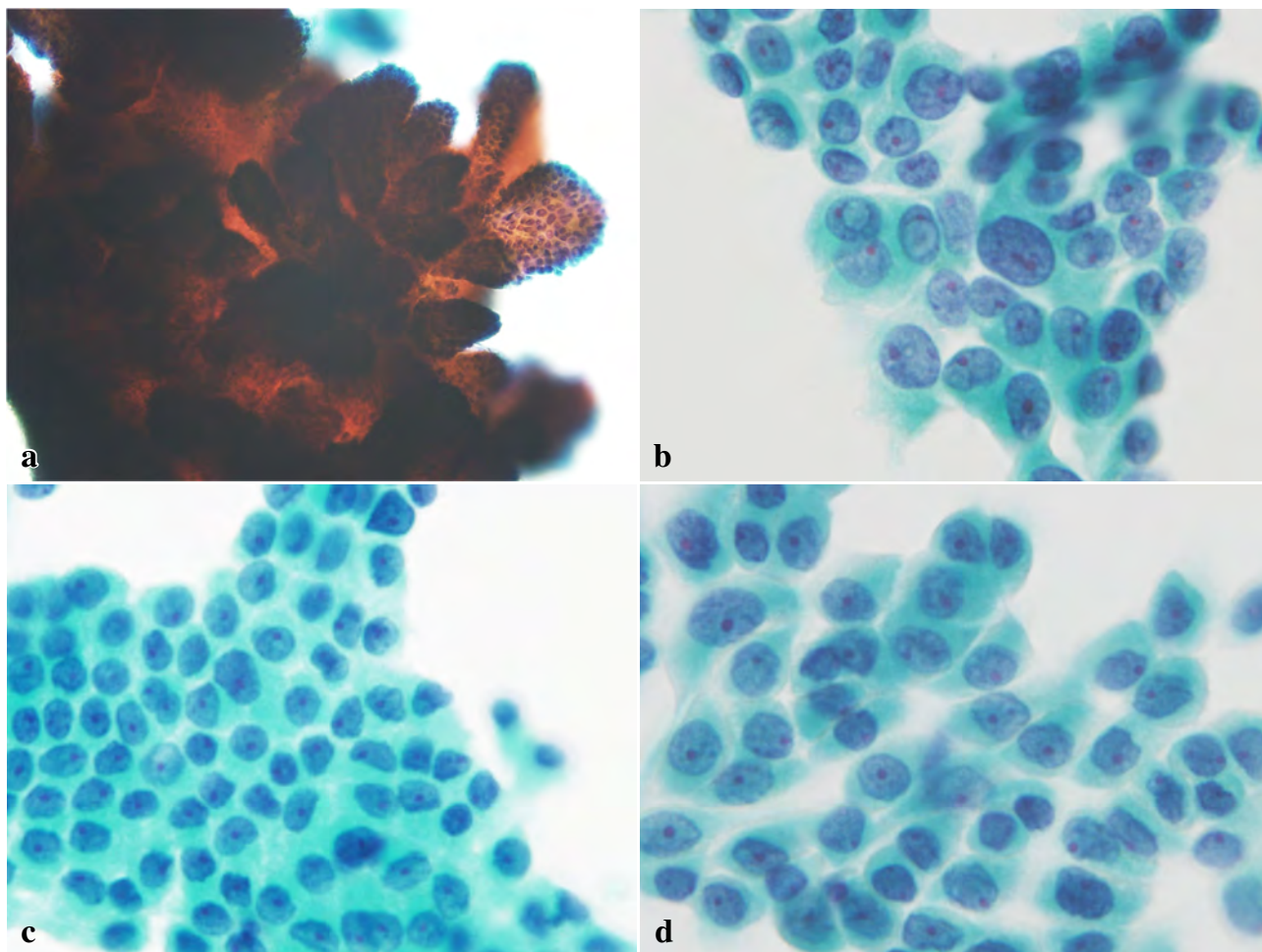


Photo. 1 Cytologic findings of papillary thyroid carcinoma in LBC specimens.
 a : Large papillary clusters. b : Intranuclear cytoplasmic inclusions and nuclear grooves. c : Zigzag nuclear irregularity. d : Sheet-like clusters with window-like spaces (Pap. staining, a : $\times 20$; b-d : $\times 100$).

炎症細胞・赤血球は減少する。乳頭癌にみられるような粘度の高いコロイドは鎌状や羽毛状に観察される。個々の細胞は従来法と比べ収縮し、小型化する。また、核小体が目立つ傾向がある。

乳頭癌では、特徴的な所見であるすりガラス状のクロマチンは観察できない。核の溝、核内細胞質封入体は CytoRich™ 標本でも同様に観察できる。前述のとおり、大型の乳頭状集塊がみられることがある。特徴的な所見として、核縁の半周以上が脳回状の凹凸不正を示す、ジグザグ状の核 (convoluted nuclei) がある。シート状集塊では、細胞間隙がみられる^{3,11)} (Photo. 1)。

III. LBC 標本作製法

甲状腺領域では、従来の吹き付け標本作製した後、シリンジや針の中に残っている細胞を LBC 保存液で洗い落

とす、LBC 併用法が一般的である (Fig. 1)。シリンジ内の残余検体の細胞量で診断可能な細胞量が採取できる。

CytoRich™ 法では、採取した検体を遠心し、沈査に精製水を加え、細胞浮遊液を専用のスライドガラス上に装着したセトリングチャンバー内に分注。細胞は、重力による細胞沈下と、荷電によりスライドガラスに吸着される (Fig. 2)。

LBC 検体は、沈査が多い場合には、1 枚標本を作成して Pap. 染色を行い、残りを保存しておく。

IV. LBC の利点と有用な症例

LBC 導入の最大の利点是不適正率の減少である。現行の癌取扱い規約⁵⁾には、検体不適正が占める割合は、細胞診検査総数の 10% 以下が望ましく、10% を超える場合は採取方法、標本作製方法についての検討が必要である、と記載

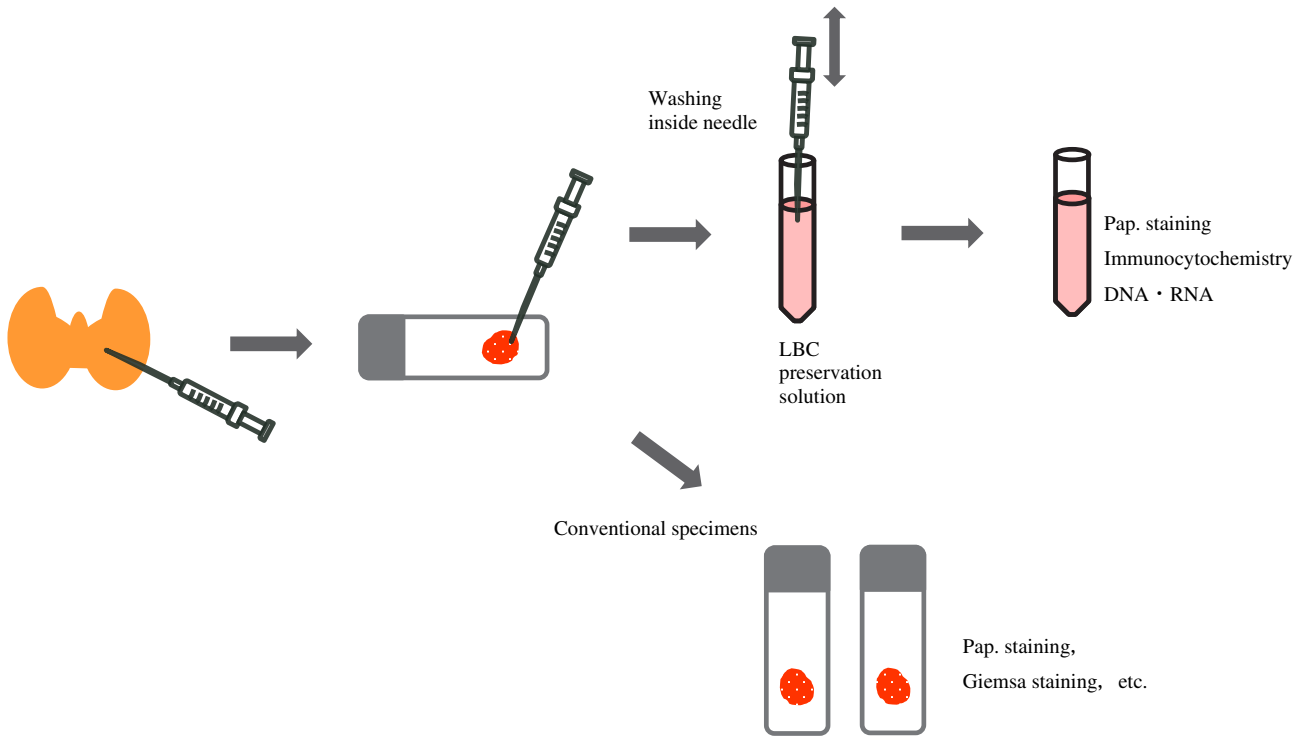


Fig. 1 Combined use of conventional smears and LBC preparations.

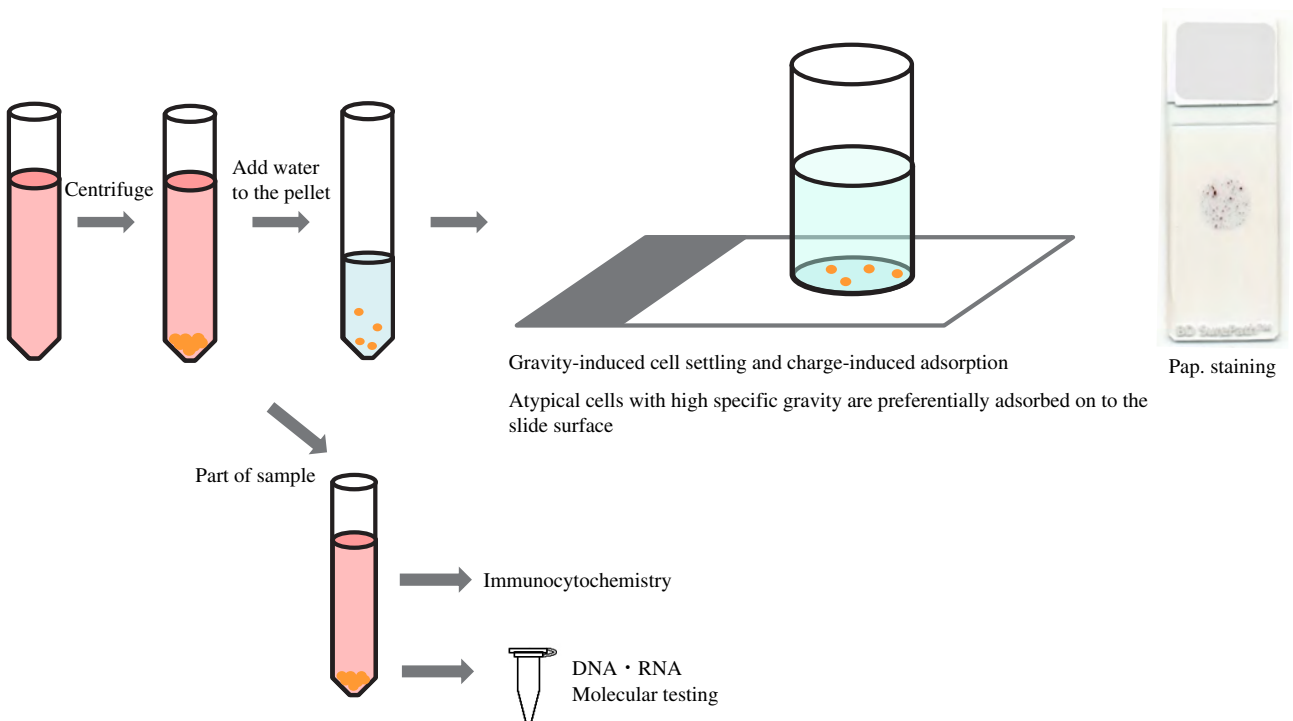


Fig. 2 Flow diagram of LBC (CytoRich™) preparation and ancillary tests, including immunocytochemistry and molecular analysis.

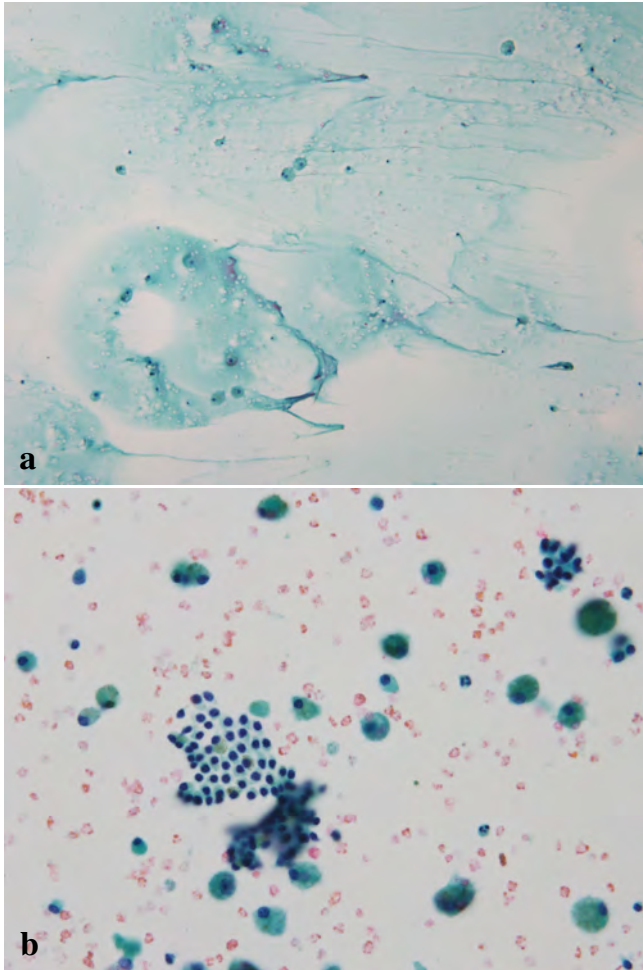


Photo. 2 Cystic fluid from benign thyroid nodules. Cyst fluid with histiocytes are seen in the conventional smears (a : Pap. staining, ×10). Benign epithelial cells are seen in the LBC smears (b : Pap. staining, ×40).

されている。標本作製方法にLBCを導入することで、標本作製時の手技による乾燥、血液過多時の血液除去不足などの人為的な原因による不適正の回避が期待できる。また、不適正率の減少のみならず、細胞回収率を上げ、診断精度を上げることが可能である。LBC単独・併用法のいずれの方法においてもLBC導入により不適正率が減少すると報告されている^{1,4,12)}。不適正率が10%を超える施設では、LBCの導入が推奨される。

有用な例としては、嚢胞成分が多く、嚢胞液が採取される良性結節では、従来法では組織球などの嚢胞液成分のみであったとしても、CytoRich™法では重量のある大型の細胞集塊が優先的に塗抹されるため、上皮細胞がみられることが多く、良性と判断することが可能である (Photo. 2)。

また、血流が豊富な濾胞性腫瘍など、穿刺時に多量の末梢血が混入した場合は、溶血作用により細胞所見が鮮明になる。甲状腺乳頭癌では石灰化などで細胞量が少ないなど、直接塗抹標本作製時に細胞量が少ないと思われる症例についても、注射器などの採取器具に残存した細胞を固定液で洗うことで、回収率が高まり、十分な細胞量が採取される。直接塗抹法では意義不明の判定に留まっていた症例の診断も期待できる (Photo. 3)。

V. LBC 標本を使用した免疫染色

直接塗抹法からの免疫染色では、細胞転写など、煩雑な作業が多く負担になることもあるが、LBC標本は複数枚の標本を同時に作製することができるため、残余検体がある場合には免疫染色の追加を容易に行うことができる。

一般的にエタノール固定は、細胞表面マーカーや細胞骨格タンパクといった不溶性抗原の保持に適している。一

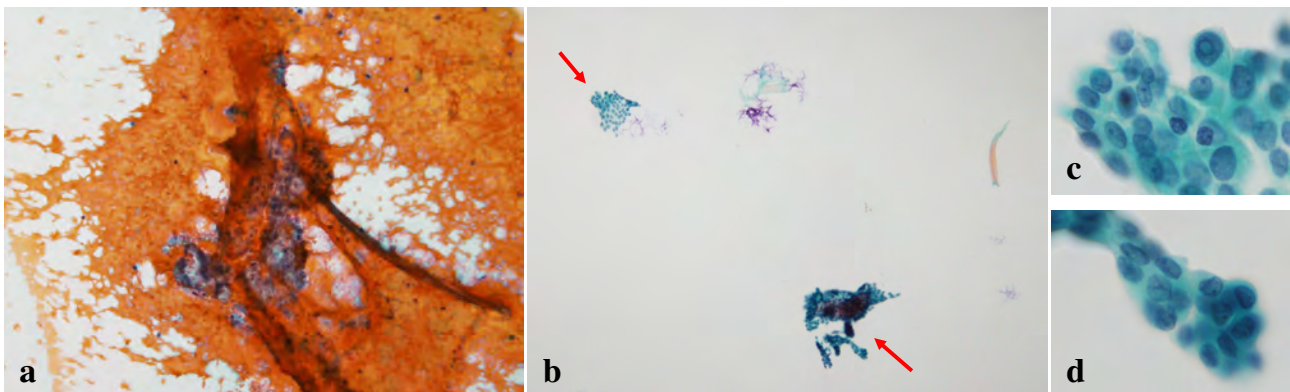


Photo. 3 Cytology specimens with peripheral blood contamination. Blood cells obscured and interfered with evaluation of the cellular elements in LBC smears (a : Pap. staining, ×10). Blood components are reduced in LBC smears, resulting in a clean background (b : Pap. staining, ×10; c, d : Pap. staining, ×100).

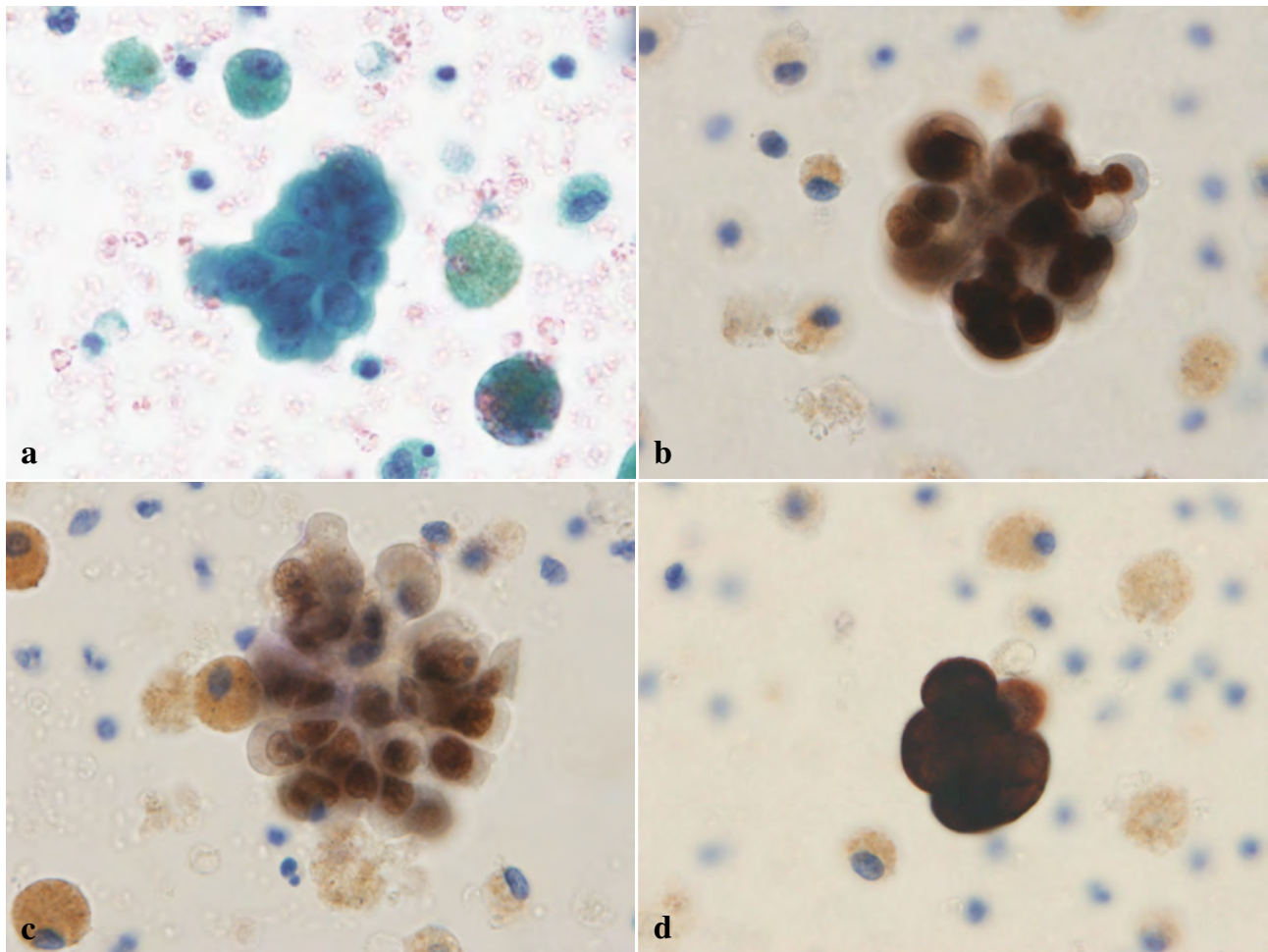


Photo. 4 Immunocytochemistry of LBC smears. Papillary carcinoma cells in cystic fluid (a : Pap. staining, ×100), TTF-1 (b : ×100), PAX8 (c : ×100), CK19 (d : ×100).

方、細胞質・核内の可溶性タンパクは、エタノールによる脱水・脱脂固定の過程で溶出するため、アルデヒド系固定液が優れている。サイトリッチレッドでは、アルコールとホルムアルデヒドの相乗効果により、抗原性の減弱が防止される⁶⁾。甲状腺細胞診の鑑別診断では、濾胞上皮細胞由来の証明のために TTF-1, PAX8 など (Photo. 4)、髄様癌ではカルシトニン、CEA、クロモグラニン A、篩型乳頭癌では β -カテニン、エストロゲンレセプターを使用することが多い。複数のマーカーを組み合わせた抗体パネルによって免疫染色を行うことで診断精度の向上につながる。

サイトリッチレッドを使用している際の染色条件は、脱パラフィン工程を除き、組織検体と同条件で行うことができるが、ホルムアルデヒド含有量は少ないものの、経時的変化により抗原性の減弱がみられる。長期間固定を行った検体では、染色プロトコルの検討が必要になる。固定時間は検体採取から 1 週間以内に免疫染色を行うことが望ましい^{6,13)}。

検体量が多い場合にはセルブロックの作製も有用である。

VI. LBC 標本を使用した遺伝子検索

甲状腺乳頭癌においてよく認められる遺伝子変異は、*BRAFV600E*, *RET/PTC*, *RAS* である。

サイトリッチレッド検体からの DNA・RNA 抽出は、市販されている抽出キットで行うことができる。サイトリッチレッドを使用した検体では、低温で保存することで、長期保存検体においても品質の良い核酸を抽出することが可能である。4℃で3ヵ月保存された検体からの DNA でも、十分な品質を保っているという報告もある¹⁴⁾。

最近では、*BRAFV600E* 遺伝子変異を同定する特異性の高いマウスモノクローナル抗体 (VE1) が市販されており、LBC 標本の免疫染色で確認することもできる。パラフィンブロック検体からの染色と比較し、感度・特異度ともに低い傾向がみられるが、LBC 検体を用いた染色でも、良好な

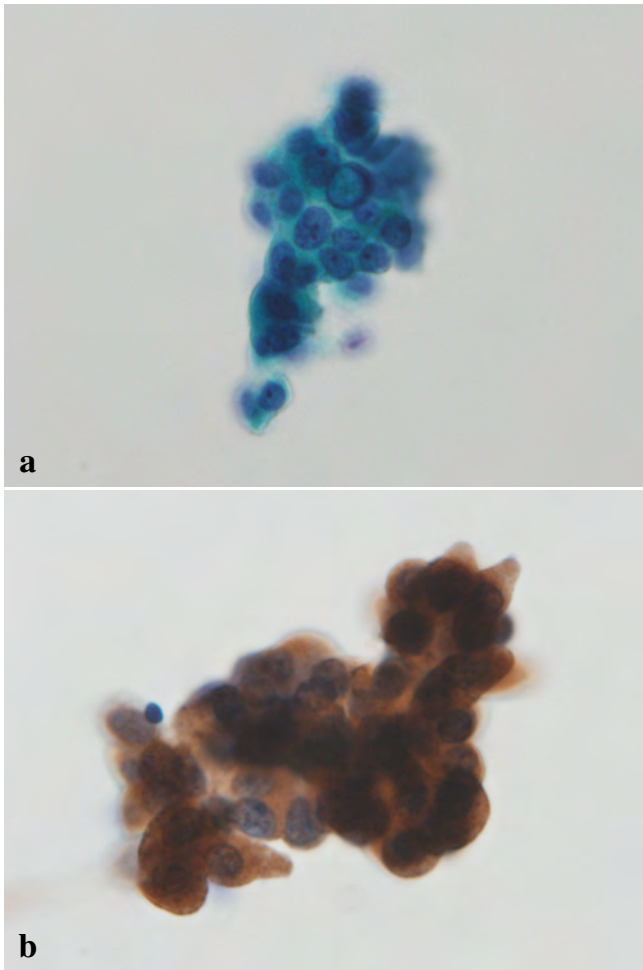


Photo. 5 Papillary carcinoma harboring the *BRAFV600E* mutation (a: Pap. staining, $\times 100$). Immunocytochemistry for *BRAFV600E* showing positive staining in the cytoplasm (b: $\times 100$).

結果が得られる (Photo. 5)^{15,16)}.

VII. おわりに

甲状腺領域におけるLBCの導入は、不適正の減少のみならず、免疫染色・遺伝子検査まで多様な検索が行え、甲状腺細胞診診断における発展が期待される。LBC併用法では、形態学的な診断には十分量の細胞が採取されるが、免疫染色・遺伝子検査を行うまでの細胞量が採取されない可能性がある。LBC単独での運用も可能であり^{1,17)}、髄様癌や転移性の腫瘍・手術困難症例など、免疫染色や遺伝子検査が必要とされる症例では、単独での運用を検討する必要がある。また、穿刺回数が複数回の場合には、穿刺回数ごとに併用法と単独法を組み合わせるとよい。

LBCの導入は、免疫染色や、遺伝子検査を加えることが

可能となり、再検査の回避や、手術困難例の診断・治療に有用な情報を得ることができる。今後の甲状腺細胞診検査においてさらなるLBCの有効活用・応用が期待される。

筆者は、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Fine needle aspiration (FNA) cytology is often used for definitive diagnosis of thyroid lesions, because the accuracy of qualitative diagnosis by this method is similar to that of core needle biopsy. LBC (liquid-based cytology) is useful and offers high-quality specimens for FNA cytology of thyroid tumors. LBC reduced the inadequate specimen rate and the quality of the preparations is not affected by the procedure. LBC samples offer improved diagnostic accuracy of immunocytochemistry, allowing avoidance of retesting, and also allow genetic testing, which allows more effective diagnosis.

文 献

- 1) 前田智治, 古谷敬三, 平田真紀子, 林 理恵, 高石裕子, 兵頭直樹・ほか. 甲状腺穿刺細胞診における従来法と液状処理細胞診 (LBC) の比較について. 日臨細胞会誌 2010; 49 (2): 108-111.
- 2) 山口朋美, 大貫なつみ, 赤羽俊章, 坂東伸幸, 田中伸哉. 甲状腺穿刺吸引細胞診におけるLBCプレップ2を用いた液状処理細胞診 (LBC). 日臨細胞会誌 2017; 56 (3): 130-136.
- 3) 鈴木彩葉, 廣川満良, 高木 希, 延岡由梨, 山尾直輝, 隈 晴二・ほか. 甲状腺における液状化検体細胞診 その有用性と形態的特徴. 日臨細胞会誌 2013; 52 (6): 495-501.
- 4) 坂東伸幸, 後藤 孝, 赤羽俊章, 大貫なつみ, 山口朋美, 佐和弘基・ほか. 甲状腺結節に対する穿刺吸引細胞診において液状処理細胞診 (Liquid-based cytology) を施行した症例の検討. 日内分泌・甲状腺外会雑誌 2013; 30 (2): 142-147.
- 5) 日本内分泌外科学会・日本甲状腺病理学会, 編. 甲状腺癌取扱いい規約第8版. 東京: 金原出版; 2019.
- 6) 川西なみ紀, 則松良明, 入野了士. シュアパス-LBC保存液を用いた免疫細胞化学染色の検討. 医学検査 2018; 67 (4): 519-523.
- 7) Kawahara, A., Taira, T., Abe, H., Watari, K., Murakami, Y., Fukumitsu, C., et al. Fixation effect of SurePath preservative fluids using epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol* 2014; 122 (2): 145-152.
- 8) Aikawa, E., Kawahara, A., Hattori, S., Yamaguchi, T., Abe, H., Taira, T., et al. Comparison of the expression levels of napsin A, thyroid transcription factor-1, and p63 in nonsmall cell lung cancer using cytocentrifuged bronchial brushings. *Cancer Cytopathol* 2011; 119 (5): 335-345.
- 9) Rossi, E. D., Martini, M., Capodimonti, S., Straccia, P., Cenci, T.,

- Lombardi, C. P., et al. Diagnostic and prognostic value of immunocytochemistry and BRAF mutation analysis on liquid-based biopsies of thyroid neoplasms suspicious for carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2013 ; 168 (6) : 853-859.
- 10) 平 紀代美. 【細胞診の精度向上を目指して—直接塗抹法・LBC法の基本と要点を整理する—】直接塗抹法・LBC法の標本作製技術の基本と形態学的差異. *Med Technol* 2014 ; 42 (7) : 666-673.
- 11) Suzuki, A., Hirokawa, M., Higuchi, M., Yamao, N., Kuma, S., Nakamura, H., et al. Cytological characteristics of papillary thyroid carcinoma on LBC specimens, compared with conventional specimens. *Diagn Cytopathol* 2015 ; 43 (2) : 108-113.
- 12) Malle, D., Valeri, R. M., Pazaitou-Panajiotou, K., Kiziridou, A., Vainas, I., Destouni, C. Use of a thin-layer technique in thyroid fine needle aspiration. *Acta Cytol* 2006 ; 50 (1) : 23-27.
- 13) Bjønness-Jacobsen, E. C., Eriksen, A. K., Hagen, V. N., Østbye, K. M., Wittersø, A., Pedersen, M. K., et al. The effect of the small amount of formaldehyde in the SurePath liquid when establishing protocols for immunocytochemistry. *Cytojournal* 2016 ; 13 : 27.
- 14) Akahane, T., Yamaguchi, T., Kato, Y., Yokoyama, S., Hamada, T., Nishida, Y., et al. Comprehensive validation of liquid-based cytology specimens for next-generation sequencing in cancer genome analysis. *PLoS One* 2019 ; 14 (6) : e0217724.
- 15) Kim, Y. H., Yim, H., Lee, Y. H., Han, J. H., Lee, K. B., Lee, J., et al. Evaluation of the VE1 antibody in thyroid cytology using ex vivo papillary thyroid carcinoma specimens. *J Pathol Transl Med* 2016 ; 50 (1) : 58-66.
- 16) Straccia, P., Brunelli, C., Rossi, E. D., Lanza, P., Martini, M., Musarra, T., et al. The immunocytochemical expression of VE-1 (BRAF V600E-related) antibody identifies the aggressive variants of papillary thyroid carcinoma on liquid-based cytology. *Cytopathology* 2019 ; 30 (5) : 460-467.
- 17) 梅澤 敬, 廣岡 信, 梅森 宮, 鈴木 英, 伊藤 聡, 堀口 絢・ほか. 手術材料で診断された甲状腺乳頭癌 100 例を用いた liquid-based FNAC の有用性についての評価. *診断病理* 2019 ; 36 (4) : 278-283.

特集

甲状腺乳頭癌亜型の細胞像とその推定意義

樋口観世子

隈病院病理診断科

乳頭癌には多くの細胞学的特徴があることから、その細胞診における診断精度は極めて高い。一方、乳頭癌には多くの亜型があり、それらを正確に推定することは容易ではない。本総説では、乳頭癌亜型の定義、臨床的特徴、細胞所見、鑑別診断などを概説している。細胞診で乳頭癌亜型を推測する意義は、①予後不良あるいは侵襲性の高い乳頭癌亜型を推定することが治療や予後の指標となる、②篩型乳頭癌を推定することは治療方針の決定に極めて重要である、③亜型の細胞像に精通することにより、より幅広い鑑別診断が行えるようになる、の三つである。一方、濾胞腺腫、NIFTP、被包型濾胞型乳頭癌の鑑別は難しいが、臨床的対応に差がないことから、それらの鑑別に執着する意義はない。乳頭癌には多くの亜型があることを認識し、非定型な細胞像を示す乳頭癌症例に遭遇した場合は、まず亜型の可能性を考える姿勢が重要である。

Key words : Thyroid, Papillary carcinoma, Variant, Cytology

I. はじめに

甲状腺乳頭癌には多くの細胞学的特徴、例えば、乳頭状集塊、核内細胞質封入体、核の溝、すりガラス状核クロマチン、砂粒体、ローピーコロイドなどが知られており、通常型（古典型）乳頭癌の診断は比較的容易で、その診断精度はかなり高い¹⁾。一方、乳頭癌には多くの亜型（特殊型）が知られており（Table 1）²⁾、それらは非定型な増殖パターンや細胞所見を示すことから、乳頭癌の診断やほかの腫瘍との鑑別に苦慮することが少なくない。一般的には、細胞診で乳頭癌亜型を正確に推定することは難しく、信頼性も低いとされている¹⁾。しかし、治療方針の決定や予後を推測するうえで亜型の推定が役立つ場合があるのも事実である。本稿では、乳頭癌亜型に焦点を当て、その特徴的

な細胞像を述べるとともに、鑑別診断や臨床的意義についても言及することにする。

II. 甲状腺乳頭癌亜型

1. 濾胞型乳頭癌（papillary carcinoma, follicular variant）

乳頭状構造を欠き、濾胞状構造のみからなる乳頭癌で、腫瘍細胞の核には乳頭癌の特徴的所見がみられる（Photo. 1a）²⁾。

細胞診では、細胞量は比較的豊富で、ロゼット様の小濾胞状配列を示す合胞様細胞集塊よりなり、背景はクリーンで、泡沫細胞、リンパ球、多核巨細胞、ローピーコロイド、砂粒体などはみられない（Photo. 1b）^{1,3,4)}。小濾胞内には濃染性で厚みのあるコロイド球が時にみられる。真の乳頭状集塊はみられない。核の溝、すりガラス状クロマチン、核内細胞質封入体などがみられるが、通常型乳頭癌と比べると出現頻度は低い。細胞質はやや薄く、細胞境界も不明瞭な傾向がある。

濾胞型乳頭癌の鑑別診断は濾胞腺腫や結節性甲状腺腫であり、乳頭癌の核所見があるかないかで判断する。乳頭癌の核所見が軽微な場合、ベセスダシステム¹⁾では核所見の程度により濾胞性腫瘍、意義不明、悪性疑いに分類される。

Variants of Papillary Thyroid Carcinoma—Cytological features and diagnostic significance—

Miyoko HIGUCHI, C. T., I. A. C.

Department of Diagnostic Pathology and Cytology, Kuma Hospital

論文別刷請求先 〒650-0011 神戸市中央区下山手通8の2の35 隈病院病理診断科 樋口観世子

令和2年7月15日受付

令和2年8月4日受理

Table 1 Variants of papillary thyroid carcinoma²⁾

1) Papillary carcinoma, follicular variant
2) Papillary carcinoma, macrofollicular variant
3) Papillary carcinoma, oxyphilic cell (oncocytic) variant
4) Papillary carcinoma, diffuse sclerosing variant
5) Papillary carcinoma, tall cell variant
6) Papillary carcinoma, solid variant
7) Papillary carcinoma, cribriform variant
8) Papillary carcinoma, hobnail variant
9) Other variants
Papillary carcinoma, clear cell variant
Warthin tumor-like papillary carcinoma
Papillary carcinoma with fibromatosis-like stroma
Papillary carcinoma with squamous cell or mucoepidermoid carcinoma

Appendix

- 1) Microcarcinoma
- 2) Encapsulated papillary carcinoma

甲状腺癌取扱い規約²⁾でも同様である。欧米の論文では乳頭癌様核所見を伴う非浸潤性濾胞型腫瘍 (noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features: NIFTP) との鑑別が議論されているが、規約²⁾では NIFTP の疾患概念はないため、本邦では NIFTP は濾胞腺腫か被包型濾胞型乳頭癌のいずれかに分類されることになる^{5,6)}。欧米の診断基準を用いると、細胞診で濾胞型乳頭癌を疑った症例が、術後に悪性ではない NIFTP と診断されることがありうるが、本邦における NIFTP の頻度は低いので、実際にはそのような症例は少ない⁷⁾。現在、細胞診で濾胞型乳頭癌と NIFTP を明確に鑑別することは不可能とされており、細胞診で NIFTP を念頭に置いた診断は必要ない。

細胞診でこの亜型推定する意義はない。また、腫瘍の大部分が濾胞状増殖をしていても、一部に乳頭状増殖があれば、組織学的には通常型乳頭癌と診断されることから、腫瘍の一部を観察する細胞診で濾胞型乳頭癌かどうかを判断することはできないと考えるべきである。

2. 大濾胞型乳頭癌 (papillary carcinoma, macrofollicular variant)

コロイドが充満した大型の濾胞が目立つ乳頭癌で、周囲の正常甲状腺濾胞の大きさよりも大きい濾胞が腫瘍の 50% 以上を占める (Photo. 2a)。大型濾胞を形成する部の腫瘍細胞では乳頭癌に特有の核所見はみられにくい、大型濾胞の間に散見される小型濾胞を形成する腫瘍細胞の核には乳頭癌の核所見がみられやすい。多くの場合被膜で囲まれているため、肉眼や弱拡大像は濾胞腺腫や腺腫様甲状腺腫に類似する。

細胞診では、背景に大型のコロイド塊が散見されるた

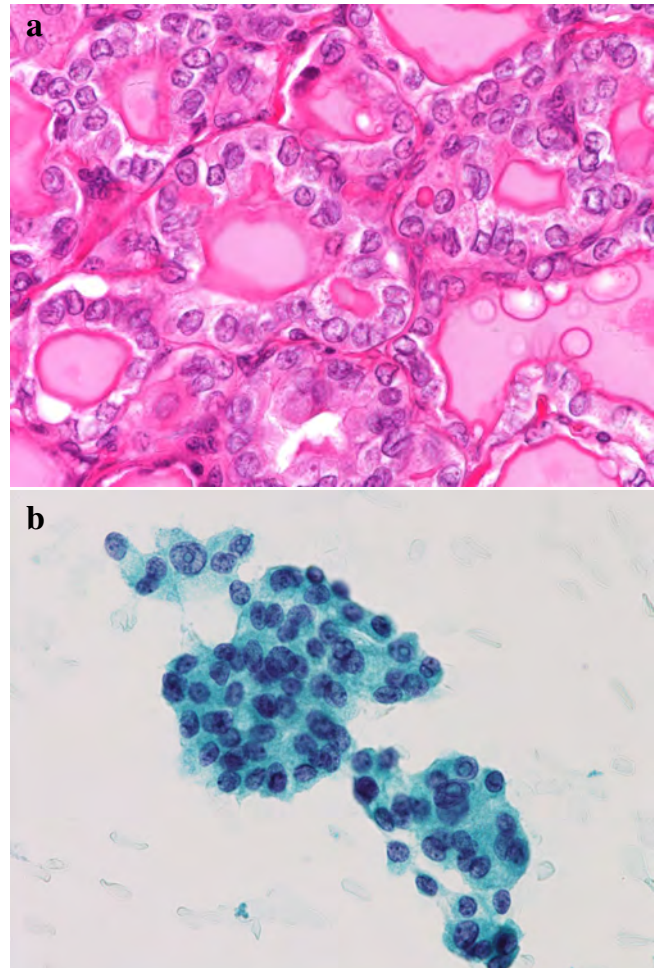


Photo. 1 Papillary carcinoma, follicular variant. a: Carcinoma cells showing a follicular growth pattern (H & E staining, $\times 40$). b: Intranuclear cytoplasmic inclusions and nuclear grooves are seen (Papanicolaou staining, $\times 40$).

め、弱拡大では腺腫様甲状腺腫のようにみえる。豊富な淡染性コロイドをみることもある (Photo. 2b)。採取細胞量は一般的に少ない。腫瘍細胞は単層シート状あるいは大小不同の濾胞状に出現する。強拡大で観察すると、それらの細胞に乳頭癌の核所見がみられる (Photo. 2c)^{1,8,9)}。濾胞型乳頭癌と同様、核の所見は軽微である。真の乳頭状集塊や砂粒体はみられない。

鑑別診断は腺腫様甲状腺腫である。大濾胞型乳頭癌は、淡染性コロイドが豊富で細胞が少なく核異型も軽微で部分的であるため、低倍視野では特徴的な核所見が見落とされやすい。したがって、良性のようにみえる標本においても、核の所見に十分注意する必要がある。

この亜型の予後は通常型よりもよいが、あえて細胞診でこの亜型を推定する意義はない。むしろ、腺腫様甲状腺腫と誤診しやすい乳頭癌の亜型として知っておくことが重要である。

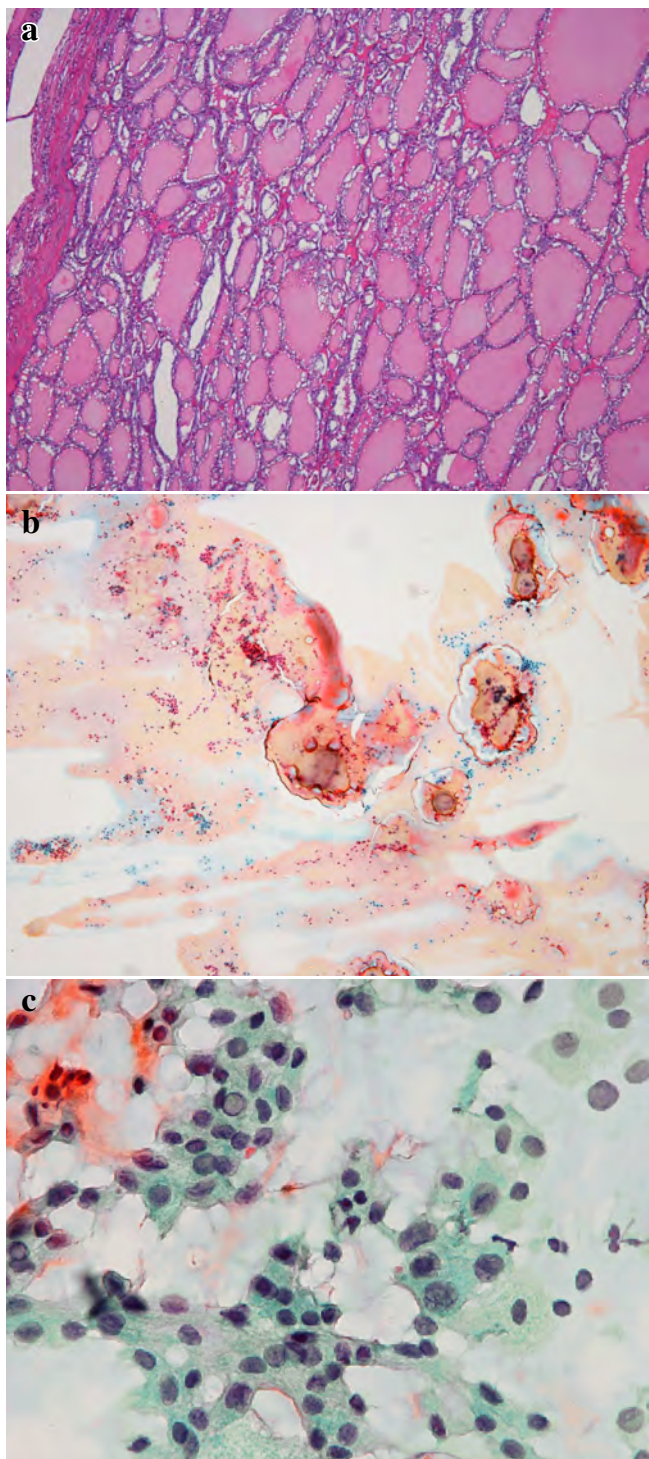


Photo. 2 Papillary carcinoma, macrofollicular variant. a : The tumor is encapsulated and composed of mainly large follicles (H & E staining, $\times 4$). b : This low-power view shows large scattered lumps of colloid (Papanicolaou staining, $\times 10$). c : Carcinoma cells showing intranuclear cytoplasmic inclusions and nuclear grooves (Papanicolaou staining, $\times 40$).

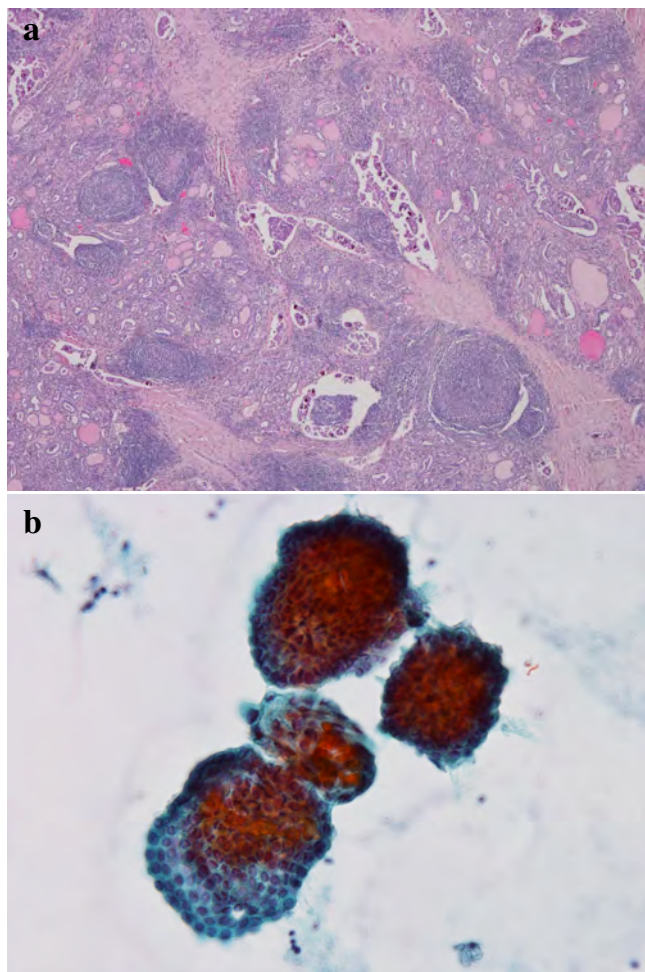


Photo. 3 Papillary carcinoma, diffuse sclerosing variant. a : Carcinoma cells are seen within dilated lymph vessels. Surrounding thyroid tissue showing evidence of chronic thyroiditis with fibrosis (H & E staining, $\times 4$). b : Ball-like clusters are seen (Papanicolaou staining, $\times 10$).

3. びまん性硬化型乳頭癌 (papillary carcinoma, diffuse sclerosing variant)

病巣が片葉全体ないしは両葉にびまん性に存在し、通常主腫瘍が不明瞭な乳頭癌である。腫瘍細胞は主として拡張したリンパ管内に腫瘍塞栓として広範に認められ (Photo. 3a), 著明な扁平上皮化生と多くの砂粒体を伴う。間質には線維増生とともに多数のリンパ球浸潤を伴うことも特徴である。

臨床的には、若年女性 (20~30 歳代) に好発し、広範なリンパ節転移を伴いやすい。甲状腺自己抗体が陽性で、橋本病やリーデル甲状腺炎に類似する。遠隔転移、主に肺への転移率が高く、無病生存率が低いが、長期生存率は通常型乳頭癌と大差ない。

細胞診では、細胞量は中等量~豊富で、背景にコロイドはほとんどみられず、リンパ球や砂粒体が目立つ。腫瘍細

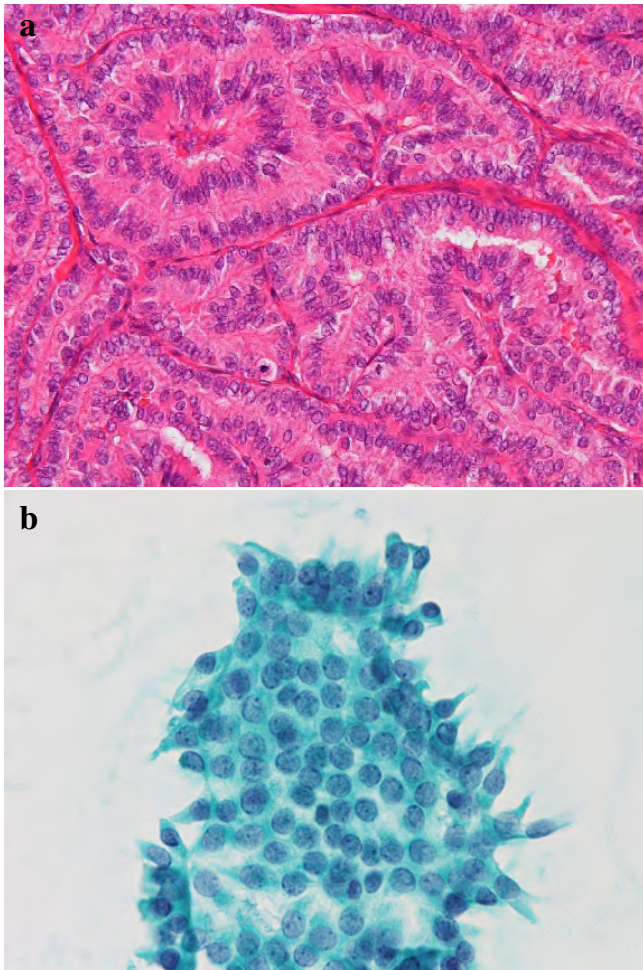


Photo. 4 Papillary carcinoma, tall cell variant. a : The heights of the carcinoma cells are three times their widths (H & E staining, $\times 10$). b : The cytoplasm of the carcinoma cells is elongated (Papanicolaou staining, $\times 40$).

胞は三次元的な球状、ミラーボール状集塊として出現し (Photo. 3b)^{1,10)}、胸水にみられる腺癌の様相を呈する。集塊内にはリンパ球や砂粒体がしばしば観察される。腫瘍細胞は円形、多角形または円柱状で、細胞質は厚く、細胞境界明瞭である。扁平上皮化生、隔壁性細胞質内空胞、細胞集塊から突き出るホブネイル細胞などもしばしば観察される。核クロマチンは暗く、定型的なすりガラス状クロマチンは通常みられない。

鑑別診断は橋本病とリンパ腫とされているが¹⁾、実際には核の溝、核内細胞質封入体、砂粒体などがみられるため、乳頭癌の診断は難しくない。本亜型の推定には、微細石灰化が散布している非結節部を穿刺することが肝要であり、結節部を穿刺すると通常型乳頭癌の像を呈することが多い¹⁰⁾。

4. 高細胞型乳頭癌 (papillary carcinoma, tall cell variant)

本亜型の特徴は背の高い、つまり縦長の腫瘍細胞から構成される (Photo. 4a) ことで、具体的には腫瘍細胞の高さが幅の3倍以上を示す細胞を“高細胞”とみなす。通常の乳頭癌でも、この基準を満たす“高細胞”はまれならず出現する。それゆえ、診断には腫瘍組織の50%以上の細胞が“高細胞”からなることが必要である。臨床的には、高齢者に発生する傾向があり、侵襲性の高い亜型である。甲状腺外進展や転移が通常型乳頭癌より多くみられる。

細胞診で高細胞型を推定するのは容易ではない^{1,11,12)}。Tanakaらは、本亜型を示唆する所見として、①核や細胞の柵状配列、②高さが幅の3倍以上ある高円柱状細胞 (Photo. 4b)、③墓石状細胞、④紡錘形細胞、⑤細胞質の伸長 (オタマジックシ様細胞)などを挙げている¹¹⁾。核内細胞質封入体が1個の核内に数個みられる所見 (soap bubble appearance) は本亜型にみられやすいとされているが、統計学的な有意差は証明されていない¹¹⁾。なお、高円柱状の形態は通常塗抹標本よりも liquid-based cytology (LBC) 標本のほうが認識しやすい¹³⁾。

この亜型を特定することは必須ではないが、侵襲性が高い腫瘍であることを術前に認識できることは治療方針に少なからず役立つ。なお、乳頭癌の穿刺経路の再発に本亜型が多いことが知られている¹⁴⁾。

5. 充実型乳頭癌 (papillary carcinoma, solid variant)

充実性ないし索状構造が優位 (50%以上) を占める乳頭癌 (Photo. 5a) で、核には乳頭癌の特徴的所見を認める。核の多形性が高度な場合、核分裂像が多い場合、壊死を伴う場合は低分化癌とする。本亜型は被爆歴のある若年者に頻度が高いとされているが、成人乳頭癌でも1~3%の頻度にもみられる¹⁵⁾。通常型と比べて肺転移の頻度が高く、成人では死亡率がやや高い。

細胞診では、採取細胞量は比較的多く、背景はクリーンで、コロイド、泡沫細胞、多核巨細胞、砂粒体、壊死物質などはみられない。腫瘍細胞は通常型乳頭癌に比べて結合性がやや弱く、立体的な充実性、索状、小濾胞状集塊として出現する (Photo. 5b)^{1,16)}。さらに、筆者らは、小乳頭状集塊が出現することも本亜型の特徴であると報告した¹⁶⁾。核は乳頭癌に定型的な所見を示すが、細胞質はより淡染性である。

充実性集塊が目立つ場合は低分化癌や髄様癌との鑑別が、小濾胞状パターンがみられる場合は濾胞型乳頭癌や濾胞性腫瘍との鑑別が問題となる。いずれも、定型的な乳頭癌の核所見の有無が鑑別に最も重要である。

本亜型を細胞診で推定する意義は少ないし、現実的に推

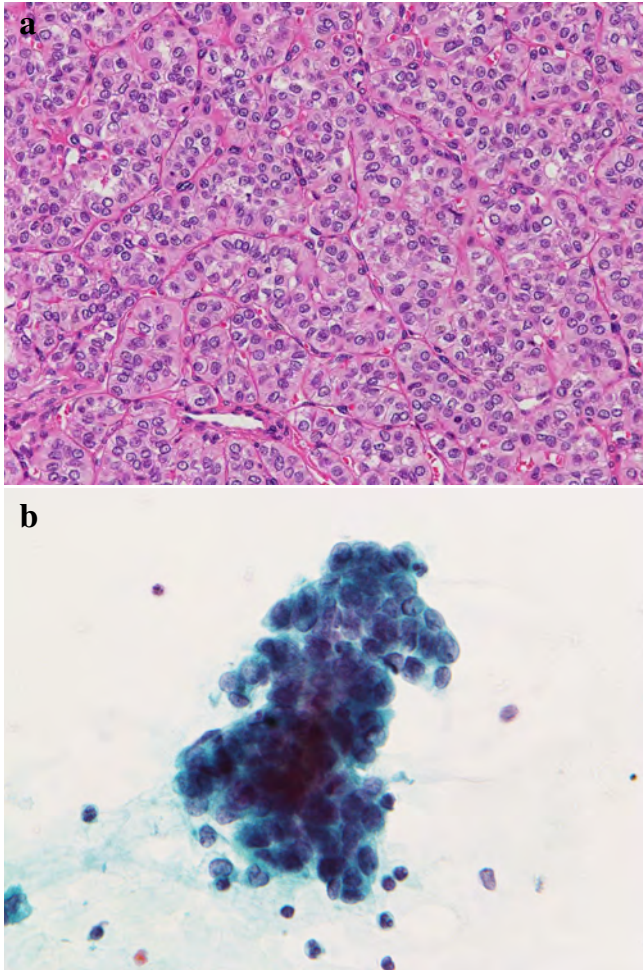


Photo. 5 Papillary carcinoma, solid variant. a : Carcinoma cells showing an alveolar or trabecular pattern (H & E staining, $\times 10$). b : Small solid clusters are seen (Papanicolaou staining, $\times 40$).

定することは困難である。臨床的には低分化癌や髄様癌に間違えないことが重要である。

6. 篩型乳頭癌 (papillary carcinoma, cribriform variant)
濾胞状構造ないしは篩状構造を示し、その腔内にコロイドがみられない像を特徴とする亜型 (Photo. 6a) で、乳頭状、索状、充実性増殖もみられる。腫瘍細胞は高円柱状、立方状、類円形、紡錘形などさまざまである。特徴的な乳頭癌の核所見に乏しく、クロマチンは細顆粒状である。多量のヒオチンを含む淡明な核 (peculiar nuclear clearing)、扁平上皮様の桑実状細胞巢 (モルラ)、核下部脂肪沈着¹⁷⁾、 β カテニンの核・細胞質陽性局在、estrogen receptor (ER) 陽性なども特徴である。

本亜型には家族性と散発性がある。家族性は家族性大腸ポリポーシスの一部分症として発生し、通常多発性である。一方、散発性は単発性である。発症年齢は40歳以下で、女性に多く、男性は極めてまれである。血清サイログ

ロブリンの上昇はみられにくい。

細胞診では、採取細胞量は多く、背景には泡沫細胞あるいはヘモジデリン貪食細胞がしばしばみられる。コロイドはみられない。弱拡大での特徴は大型細胞集塊内にコロイドを含まない数個の管状、スリット状の空隙がみられ (篩状パターン)、空隙間には橋状の細い索状隔壁 (bridging) が存在する^{1,18,19)}。腫瘍細胞は高円柱状で、乳頭状、柵状配列を示す (Photo. 6b)。モルラも本症に特徴的であるが、まれにしか観察できない。孤立散在性に出現する紡錘形腫瘍細胞がみられることもある。核クロマチンは顆粒状で、核内細胞質封入体が出現する頻度は低い (58%)¹⁹⁾。核全体が淡明化した peculiar nuclear clearing (真の封入体) の存在は本亜型の特徴であるが、偽封入体である核内細胞質封入体との区別を要する。硝子化物質が集塊内あるいは背景にみられることがある。砂粒体や多核巨細胞はみられない。

他の亜型や通常型との共通所見が多いことから、本亜型の推定は容易ではない。疑われる症例では、 β カテニンや ER の免疫染色が有用である。 β カテニン染色は核と細胞質に、ER は核に陽性局在がみられる (Photo. 6c, d)。顆粒状クロマチンの存在は髄様癌との鑑別を要するが、髄様癌では結合性が乏しく、乳頭状配列はみられない。高細胞が目立つ場合は、高細胞型や円柱細胞型が鑑別に挙げられるが、それらは浸潤性で、高齢者に好発する。一方、本亜型は被包性あるいは限局性で、若年者に好発することから、臨床所見が参考になる。

細胞診での本亜型の推定は手術方針を決定するうえで極めて重要である。本亜型が推定されると、家族性大腸ポリポーシスの検索が行われる。APC 遺伝子異常があれば、篩型乳頭癌は多発性であるため、たとえ単発性、被包性、リンパ節転移なしであっても全摘術が適応される。一方、散発性 (APC 遺伝子異常なし) であれば葉切除術となる。

7. ホブネイル型乳頭癌 (papillary carcinoma, hobnail variant)

悪性度の高い乳頭癌で、①血管結合組織性間質を伴わない微小乳頭状増殖 (piling up, micropapillary pattern)、②ホブネイル細胞、③腫瘍細胞の結合性低下、によって特徴づけられ、そのような部が腫瘍の30%以上を占める亜型である。ホブネイル細胞は、細胞質が内腔側に飛び出し、核はその先端に位置し、核小体が明瞭で、細胞質は好酸性を示す (Photo. 7a)。

細胞診では、接着性が乏しく、核の極性が反転する腫瘍細胞 (ホブネイル細胞) が孤立散在性、微小乳頭状に出現する (Photo. 7b)。ホブネイル細胞は、核の偏在と先細り状の細胞質 (彗星型、涙滴様) を特徴とする¹⁾。核の soap bubble appearance がみられやすい (Photo. 7b, inset)。

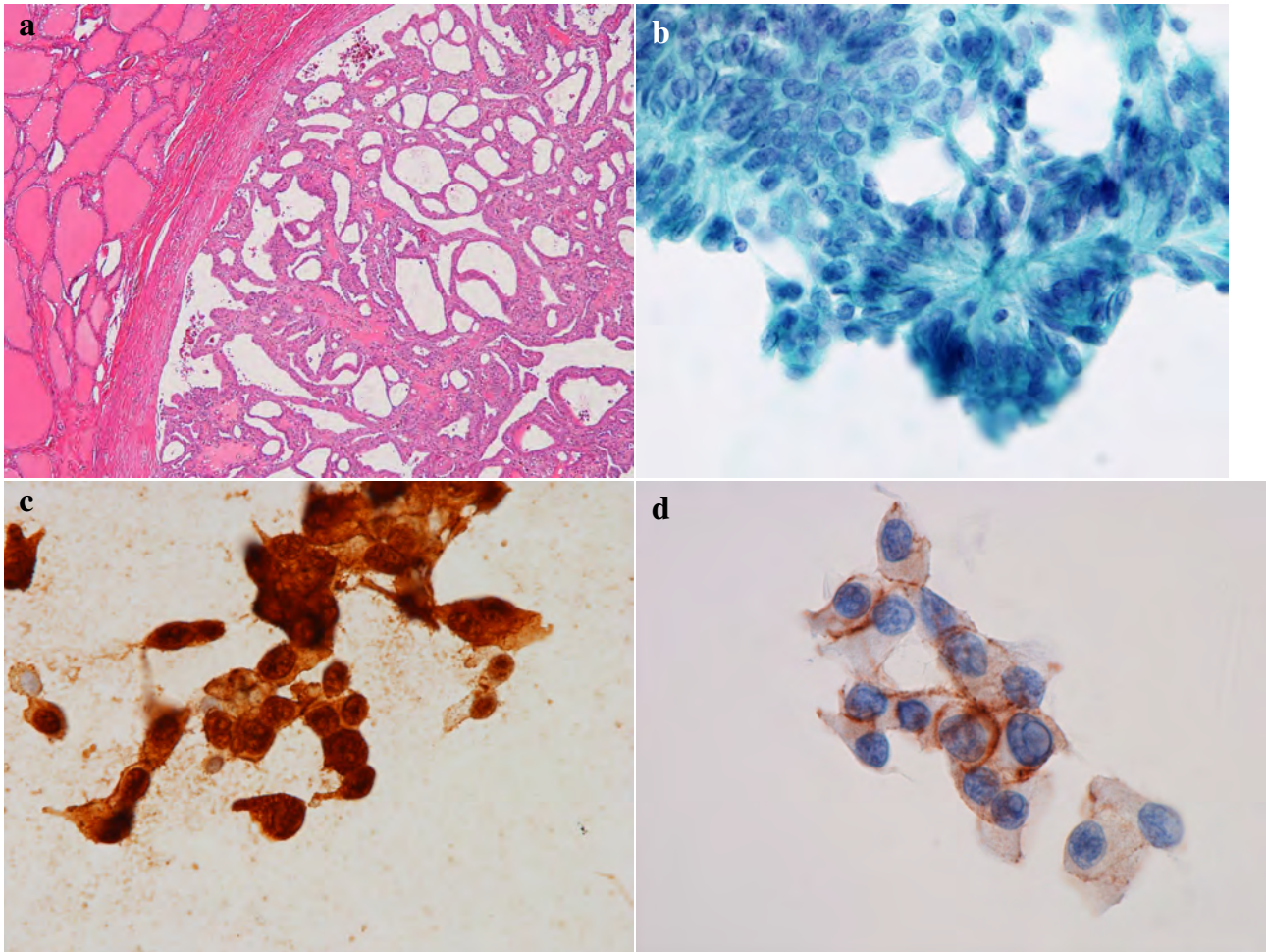


Photo. 6 Papillary carcinoma, cribriform variant. a : The tumor is encapsulated with thick fibrous connective tissue. A cribriform structure without colloid is seen (H & E staining, $\times 4$). b : Tall columnar carcinoma cells showing a palisade arrangement (Papanicolaou staining, $\times 40$). c : Immunocytochemistry showing positive nuclear and cytoplasmic staining for β -catenin (Immunostaining for β -catenin, $\times 40$). d : Conventional papillary carcinoma cells showing positive staining of the cell membrane (Immunostaining for β -catenin, $\times 40$).

高細胞型，円柱細胞型，びまん性硬化型などの侵襲性の高い乳頭癌亜型と細胞像が重複する。ホブネイル状の形態は液状処理検体で同定しやすく，好酸性，嚢胞状，淡明細胞性変化を伴うこともある。ホブネイル状あるいは微小乳頭状パターンを示す他臓器腫瘍（例えば乳腺，肺，卵巣）の甲状腺転移と鑑別する必要があるとされている¹⁾。

細胞診でこの亜型を推測することにより悪性度の高い腫瘍であることを術前に把握し，治療方針の決定に役立つ。また，この亜型が推定された場合は，転移癌の可能性を必ず考慮すべきである。

8. ワルチン腫瘍様乳頭癌 (Warthin tumor-like papillary carcinoma)

唾液腺のワルチン腫瘍に類似した組織像を示す亜型である。橋本病を背景に発生し，境界は比較的明瞭である。増殖パターンは主として乳頭状で，腫瘍細胞は高円柱状，好

酸性である。間質にはリンパ球，形質細胞の浸潤が強く，リンパ濾胞の形成を伴う (Photo. 8a)。形質細胞は多クローン性で，しばしば IgG4 陽性形質細胞が目立つ²⁰⁾。予後は通常型の乳頭癌と同様である。

細胞診では，背景に多数のリンパ球，形質細胞がみられる。腫瘍細胞は好酸性，高円柱状で，乳頭状，シート状，柵状配列を示す。核クロマチンは細～粗顆粒状で，乳頭癌に定型的なクロマチンパターンではないが，核内細胞質封入体は観察される (Photo. 8b)²¹⁾。

通常型乳頭癌でもしばしば背景に豊富なリンパ球が出現することがある。腫瘍細胞が好酸性であり，背景に橋本病がある場合に本亜型を考慮するが，本亜型を積極的に推定する臨床的意義はない。ただし，好酸性細胞が出現するその他の腫瘍や橋本病との鑑別が必要なことから，この疾患概念や細胞像に精通していることは重要である。

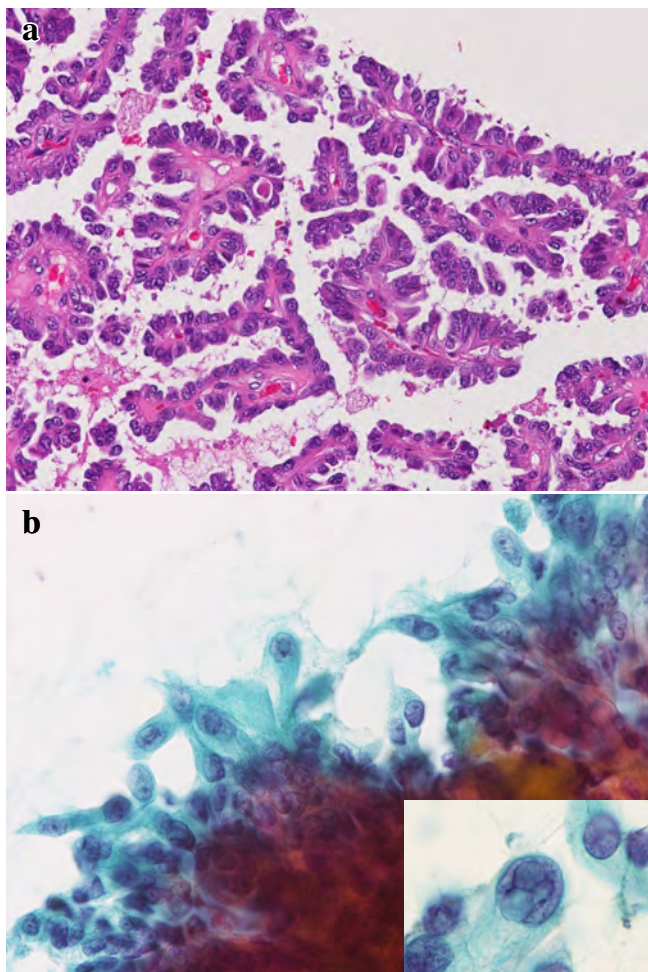


Photo. 7 Papillary carcinoma, hobnail variant. a : Carcinoma cells showing a micropapillary growth pattern (H & E staining, ×10). b : Eccentrically located nuclei and elongated cytoplasm are seen at the periphery of the papillary clusters (Papanicolaou staining, ×40). b inset : Soap bubble appearance (Papanicolaou staining, ×100).

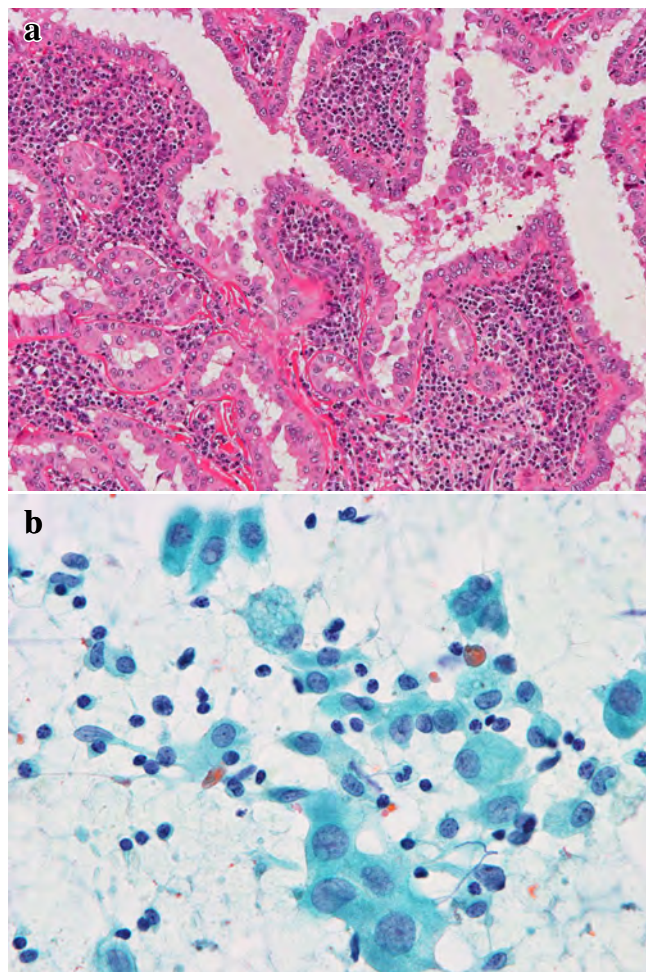


Photo. 8 Warthin tumor-like papillary carcinoma. a : Carcinoma cells showing a papillary growth pattern, with an abundance of lymphocytes and plasma cells in the stroma (H & E staining, ×10). b : Tall columnar carcinoma cells with eosinophilic cytoplasm and lymphocytes are seen (Papanicolaou staining, ×40).

9. 線維腫症様の間質を伴う乳頭癌 (papillary carcinoma with fibromatosis-like stroma)

デスマイド型線維腫症に類似した間質を伴う乳頭癌である (Photo. 9a). 当初, 筋膜炎様の間質を伴う乳頭癌 (Papillary carcinoma with fasciitis-like stroma) として報告されていたが, 最近では組織像が結節性筋膜炎よりもデスマイド腫瘍に類似していること, β カテニンの遺伝子異常があることから, この名称を用いるほうがよいとされている^{22,23}. 予後的には通常型乳頭癌との違いはない.

デスマイド型線維腫症様の間質 (Photo. 9b) が豊富に塗抹されることはまれで, たとえ塗抹されていたとしても desmoplastic な間質との区別が難しいことから, 細胞診ではこの亜型を推測することは困難であるし, また本亜型を推測する臨床的意義もない.

10. 微小癌 (papillary microcarcinoma)

病巣の最大径が1 cm 以下のものを微小癌という (Photo. 10a). 規約²⁾では, 微小癌は組織亜型ではなく, 付)として記載されている. 定義が大きさのみによって規定されていることから, その組織像や細胞像は多種多様であるはずであるが, 実際にはほとんどが通常型で (Photo. 10b)²⁴, 予後不良な亜型をしめすことはきわめてまれである. 本邦では, 超音波で悪性を疑う5 mm 以上の結節が細胞診の対象になるため, 細胞診で微小癌が診断される機会は多い. その際, 低リスク群の乳頭癌では積極的経過観察が推奨されている²⁵.

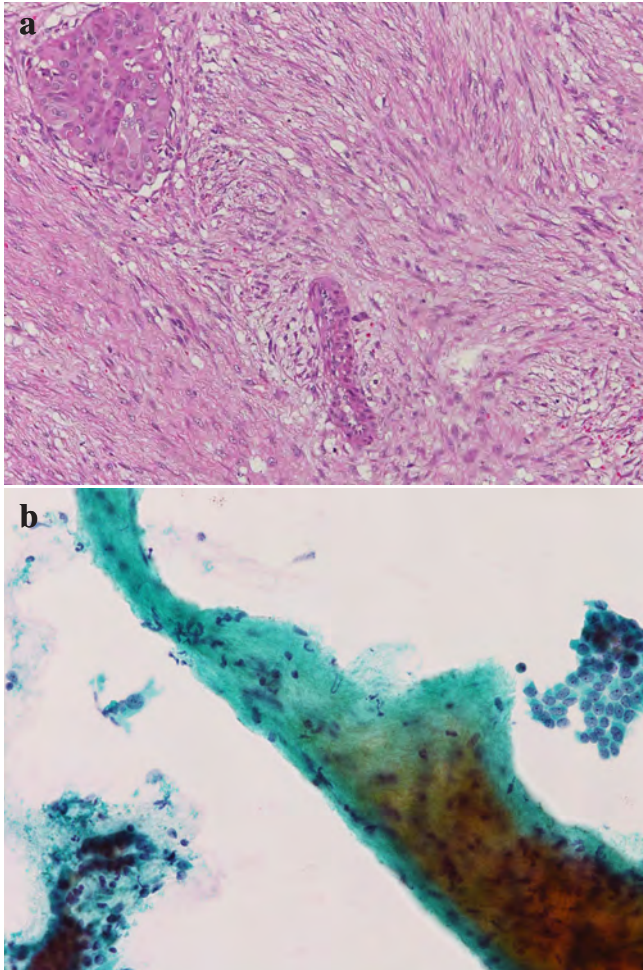


Photo. 9 Papillary carcinoma with fibromatosis-like stroma. a : The stroma is composed of desmoid-like connective tissue (H & E staining, $\times 20$). b : Connective tissue with fibroblasts is seen (Papanicolaou staining, LBC, $\times 20$).

III. その他

1. 円柱細胞型 (papillary carcinoma, columnar cell variant)

偽重層化を示す高円柱状腫瘍細胞が乳頭状、索状、濾胞状、管腔状、充実性に増殖する亜型である (Photo. 11a)²⁾。コロイドの貯留は乏しい。核は短紡錘形、クロマチンは顆粒状で、乳頭癌に特有の核所見を欠くか、乏しいことが、定型的な乳頭癌の核所見を有する高細胞型と異なる。時に、核下空胞や淡明な細胞質を示すことがあり、子宮内膜や大腸の腺癌に非常に類似することから、これらの腫瘍の転移との鑑別が必要である。規約²⁾では、定型的な乳頭癌の核所見を欠くことと予後が不良であることから、乳頭癌の亜型ではなく、その他の腫瘍の中に円柱細胞癌 (columnar cell carcinoma) として分類されている。

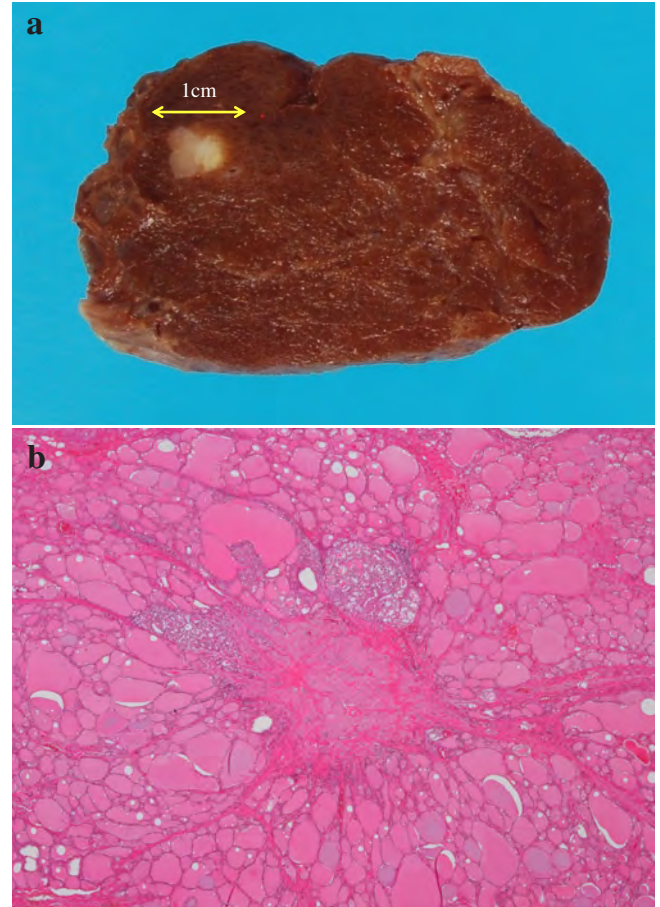


Photo. 10 Papillary microcarcinoma. a : The tumor is less than 1 cm in diameter. b : The tumor is composed of conventional papillary carcinoma cells and a central hyalinized stroma (H & E staining, $\times 4$).

細胞診では、採取細胞量は豊富で、コロイドは通常みられない。腫瘍細胞は乳頭状、集塊状、平面的シート状配列を示し、小型腺管構造がみられることもある^{1,26)}。核は細長く、柵状に配列し、偽重層化を伴う (Photo. 11b)。クロマチンは暗く、顆粒状である。細胞質内空胞を有するものもある。

円柱状で、核が暗調であることから、気管貫通時に採取される良性の気管上皮と誤認されるかもしれない。気管上皮であれば線毛や終末板がみられる。形態的に円柱細胞癌は大腸癌や子宮内膜癌に酷似しているため、それらからの転移を除外することは極めて難しい。転移性では壊死性背景がみられやすいが、円柱細胞癌でも時に壊死がみられることがある。

細胞診でこの亜型を推定することは可能だが、転移癌との区別が難しいことを報告書に記載すべきである。

2. 嚢胞形成性乳頭癌 (cystic papillary carcinoma)

ほとんどが嚢胞部からなる乳頭癌がある (Photo. 12a,

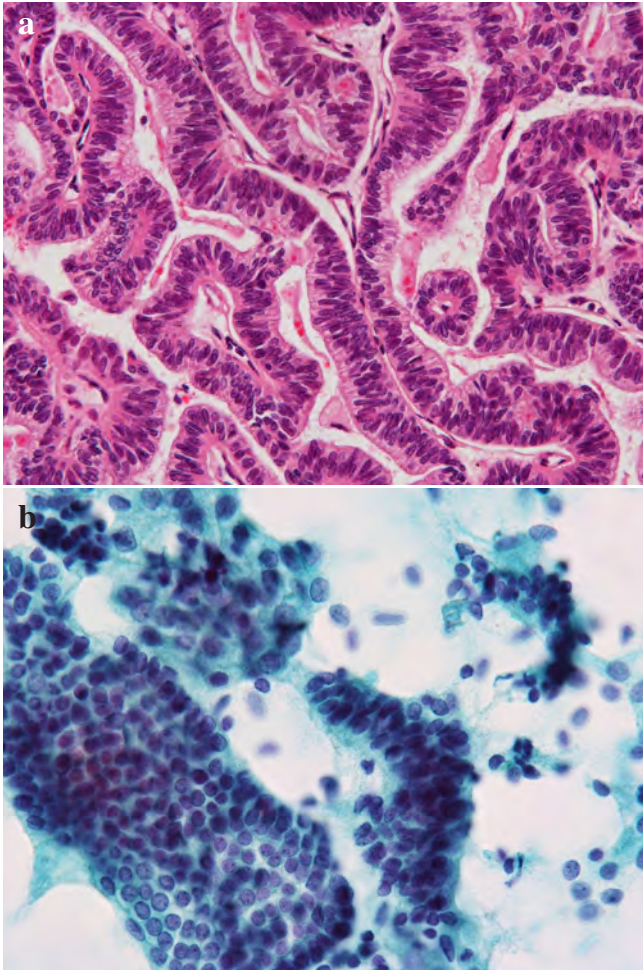


Photo. 11 Papillary carcinoma, columnar cell variant. a : The carcinoma cells are tall columnar, and their nuclei are spindle-shaped, hyperchromatic, and pseudostratified (H & E staining, $\times 20$). b : Tall columnar carcinoma cells showing a palisaded appearance (Papanicolaou staining, $\times 40$).

b). 正式な乳頭癌亜型ではないが、臨床的・病理学的な特徴があることから、一般的に嚢胞形成性乳頭癌と呼ばれている。超音波では大きな嚢胞内にポリープ状に飛び出した充実部がみられ、腺腫様甲状腺腫との区別が難しい。

細胞診では、腫瘍細胞数は少なく、背景に泡沫細胞が多数みられる。乳頭癌細胞はミラーボール状、乳頭状、孤立散在性に出現し、隔壁性細胞質内空胞、印環型細胞、ホブネイル細胞などがみられやすい (Photo. 12c)²⁷⁾。嚢胞部を穿刺すると、泡沫細胞のみがみられる液状検体が採取され、良性と判断される危険性があるため、充実部を穿刺することが重要である²⁸⁾。ベセスダシステムでは、泡沫細胞のみがみられる液状検体の場合は、本亜型が除外できないという理由から「検体不適正」として報告するとしている¹⁾が、本邦では、そのような場合の悪性の危険度は極めて低

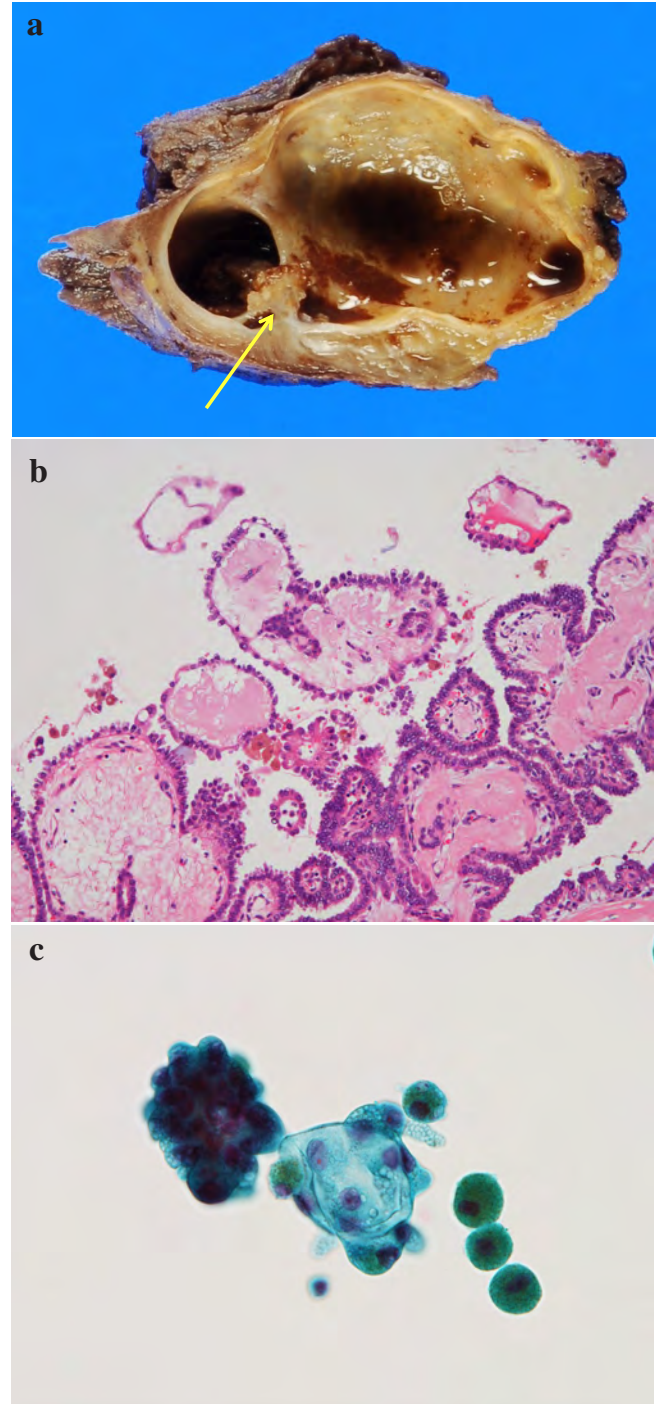


Photo. 12 Cystic papillary carcinoma. a : The tumor is mostly cystic, with a small solid component (arrow). b : The solid component shows papillary proliferation with an edematous and/or sclerotic stroma lined by hobnail cells (H & E staining, $\times 4$). c : Carcinoma cells are seen in ball-like clusters or mirror ball-like clusters. There are foamy histiocytes in the background (Papanicolaou staining, $\times 40$).

いことから、「検体不適正」には含めず、「嚢胞液」として報告する^{29,30}。

IV. ま と め

乳頭癌亜型の定義、臨床的特徴、細胞所見、鑑別診断などについて概説した。細胞診で乳頭癌亜型を推測する意義は三つある。一つ目は、予後不良あるいは侵襲性の高い乳頭癌亜型、例えば高細胞型、円柱細胞型、ホブネイル型などを推定することが治療や予後の指標となる。二つ目は篩型乳頭癌を推定することは治療方針の決定に極めて重要である。三つ目は、亜型の細胞像に精通することにより、より幅広い鑑別診断が行えるようになることである。報告様式に関しては、亜型の断定は難しいことから、推定診断名とはせずに可能性を示唆するとのコメントに留めるのが良策と考える。一方、濾胞腺腫、NIFTP、被包型濾胞型乳頭癌などの鑑別は難しいが、臨床的対応に差がないことから、それらの鑑別に執着する意義はない。乳頭癌には多くの亜型があることを認識し、非定型的な細胞像を示す乳頭癌症例に遭遇した場合は、まず亜型の可能性を考える姿勢が重要である。

筆者は、開示すべき利益相反状態はありません。

なお、本総説は第61回日本臨床細胞学会総会春期大会（2020年）のシンポジウム8「甲状腺細胞診—さらなる発展へ向けての展望—」にて発表した内容である

Abstract

As papillary thyroid carcinoma (PTC) has many characteristic cytological features, the diagnostic accuracy of cytology is extremely high. However, it is not easy to diagnose variants of PTC. This review describes the definitions, clinical features, cytological findings and differential diagnoses of variants of PTC. The significance of diagnosing variants of PTC by cytology is as follows : 1) Diagnosis of variants with an aggressive nature or carrying a poor prognosis is useful for determining the treatment policy and predicting the prognosis ; 2) Diagnosis of the cribriform variant facilitates determination of the surgical procedure ; 3) Familiarity with the cytological findings of the variants would enable easy differential diagnosis. When PTCs with unusual cytological findings are encountered, it is important to consider the possibility of variants.

文 献

1) Ali, S. Z., Cibas, E. S. The Bethesda System for Reporting Thy-

roid Cytopathology : Definitions, Criteria and Explanatory Notes (Second Edition). New York : Springer ; 2017.

- 2) 甲状腺外科研究会, 編. 甲状腺癌取扱い規約(第8版). 東京 : 金原出版 ; 2019.
- 3) Strickland, K. C., Howitt, B. E., Marqusee, E., Alexander, E. K., Cibas, E. S., Krane, J. F., et al. The impact of non-invasive follicular variant of papillary thyroid carcinoma on rates of malignancy for fine-needle aspiration diagnostic categories. *Thyroid* 2015 ; 25 : 987-992.
- 4) Faquin, W. C., Wong, L. Q., Afrogheh, A. H., Ali, S. Z., Bishop, J. A., Bongiovanni, M., et al. Impact of reclassifying noninvasive follicular variant of papillary thyroid carcinoma on the risk of malignancy in the Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Cancer Cytopathol* 2016 ; 124 : 181-187.
- 5) Hirokawa, M., Higuchi, M., Suzuki, A., Hayashi, T., Kuma, S., Miyauchi, A. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features : a single-institutional experience in Japan. *Endocr J* 2017 ; 64 : 1149-1155.
- 6) Hirokawa, M., Higuchi, M., Suzuki, A., Hayashi, T., Kuma, S., Miyauchi, A. Prevalence and diagnostic significance of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features among tumors previously diagnosed as follicular adenoma : a single-institutional study in Japan. *Endocr J* 2020 ; 67 : 1071-1075. DOI : <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ20-0198>.
- 7) Higuchi, M., Hirokawa, M., Kanematsu, R., Tanaka, A., Suzuki, A., Yamao, N., et al. Impact of the modification of the diagnostic criteria in the 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology : a report of a single institution in Japan. *Endocr J* 2018 ; 65 : 1193-1198.
- 8) Hirokawa, M., Shimizu, M., Terayama, K., Kanahara, T., Sonoo, H., Manabe, T. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma. Report of a case with fine needle aspiration biopsy findings. *Acta Cytol* 1998 ; 42 : 1441-1443.
- 9) Chung, D., Ghossein, R. A., Lin, O. Macrofollicular variant of papillary carcinoma—a potential thyroid FNA pitfall. *Diagn Cytopathol* 2007 ; 35 : 560-564.
- 10) Takagi, N., Hirokawa, M., Nobuoka, Y., Higuchi, M., Kuma, S., Miyauchi, A. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma : a study of fine needle aspiration cytology in 20 patients. *Cytopathology* 2014 ; 25 : 199-204.
- 11) Tanaka, A., Hirokawa, M., Higuchi, M., Suzuki, A., Yamao, N., Hayashi, T., et al. Diagnostic clues indicating tall cell variants of papillary thyroid carcinoma in fine needle aspiration. *Diagn Cytopathol* 2019 ; 47 : 452-457.
- 12) Guan, H., Vandenbussche, C. J., Erozan, Y. S., Rosenthal, D. L., Tatsas, A. D., Olson, M. T., et al. Can the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma be distinguished from the conventional type in fine needle aspirates? A cytomorphologic study with assessment of diagnostic accuracy. *Acta Cytol* 2013 ; 57 : 534-542.
- 13) Suzuki, A., Hirokawa, M., Higuchi, M., Yamao, N., Kuma, S.,

- Nakamura, H., et al. Cytological characteristics of papillary thyroid carcinoma on LBC specimens, compared with conventional specimens. *Diagn Cytopathol* 2015 ; 43 : 108-113.
- 14) Hayashi, T., Hirokawa, M., Higuchi, M., Kudo, T., Ito, Y., Miyauchi, A. Needle Tract Implantation Following Fine-Needle Aspiration of Thyroid Cancer. *World J Surg* 2020 ; 44 : 378-384.
- 15) Lloyd, R. V., Osamura, R. Y., Klöppel, G., Rosai, J. WHO Classification of tumours of endocrine organs. Lyon : IARC Press : 2017.
- 16) Higuchi, M., Hirokawa, M., Suzuki, A., Takada, N., Yamao, N., Kuma, S., et al. Cytological features of solid variants of papillary thyroid carcinoma : a fine needle aspiration cytology study of 18 Cases. *Cytopathology* 2017 ; 28 : 268-272.
- 17) Takada, N., Hirokawa, M., Ito, A., Suzuki, A., Higuchi, M., Kuma, S., et al. Cytoplasmic Lipid Accumulation Characteristic of the Cribriform Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Pathobiology* 2017 ; 84 : 251-257.
- 18) Kuma, S., Hirokawa, M., Xu, B., Miyauchi, A., Kukudo, K., Sano, T. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma. Report of a case showing morules with peculiar nuclear clearing. *Acta Cytol* 2004 ; 48 : 431-436.
- 19) Hirokawa, M., Maekawa, M., Kuma, S., Miyauchi, A. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma—cytological and immunocytochemical findings of 18 cases. *Diagn Cytopathol* 2010 ; 38 : 890-896.
- 20) Hirokawa, M., Nishihara, E., Takada, N., Higuchi, M., Kotake-mori, M., Hayashi, T., et al. Warthin-like papillary thyroid carcinoma with immunoglobulin G4-positive plasma cells possibly related to Hashimoto's thyroiditis. *Endocr J* 2018 ; 65 : 175-180.
- 21) 高木 希, 廣川満良, 延岡由梨, 樋口観世子, 隈 晴二, 宮内 昭. 甲状腺ワルチン腫瘍様乳頭癌 33 例の細胞所見. *日臨細胞会誌* 2013 ; 52 : 116-121.
- 22) Takada, N., Hirokawa, M., Ito, M., Ito, A., Suzuki, A., Higuchi, M., et al. Papillary thyroid carcinoma with desmoid-type fibromatosis : A clinical, pathological, and immunohistochemical study of 14 cases. *Endocr J* 2017 ; 64 : 1017-1023.
- 23) Takada, N., Mussazhanova, Z., Hirokawa, M., Nakashima, M., Miyauchi, A. Immunohistochemical and Molecular Analyses Focusing on Mesenchymal Cells in Papillary Thyroid Carcinoma with Desmoid-Type Fibromatosis. *Pathobiology* 2018 ; 85 : 300-303.
- 24) Hirokawa, M., Kudo, T., Ota, H., Suzuki, A., Miyauchi, A. Pathological characteristics of low-risk papillary thyroid microcarcinoma with progression during active surveillance. *Endocr J* 2016 ; 63 : 805-810.
- 25) Miyauchi, A., Ito, Y., Oda, H. Insights into the Management of Papillary Microcarcinoma of the Thyroid. *Thyroid* 2018 ; 28 : 23-31.
- 26) Jayaram, G. Cytology of columnar-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2000 ; 22 : 227-229.
- 27) 広川満良, 光岡永恵, 清水道生, 則松良明, 津嘉山朝達. 甲状腺嚢胞性乳頭癌の穿刺吸引細胞診. *日臨細胞会誌* 1996 ; 35 : 205-210.
- 28) Hirokawa, M., Suzuki, A., Miyauchi, A. Thyroid fine-needle aspiration and smearing techniques. *Video Endocrinology* 2018 ; 5 : ve.2018.0119. DOI : 10.1089/ve.2018.0119.
- 29) Takada, N., Hirokawa, M., Suzuki, A., Higuchi, M., Kuma, S., Miyauchi, A. Reappraisal of “cyst fluid only” on thyroid fine-needle aspiration cytology. *Endocr J* 2017 ; 64 : 759-765.
- 30) Kanematsu, R., Hirokawa, M., Higuchi, M., Suzuki, A., Aga, H., Tanaka, A., et al. Risk of malignancy and clinical outcomes of cyst fluid only nodules in the thyroid based on ultrasound and aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2020 ; 48 : 30-34.

甲状腺腫瘍におけるゲノム異常と展望

近藤 哲夫

山梨大学医学部人体病理学

濾胞上皮由来甲状腺癌は、予後良好な微小型乳頭癌から極めて侵襲性の高い未分化癌に至るまで、腫瘍の分化と悪性度は広範囲にわたる。この甲状腺癌の発癌とプログレッションの過程には、段階的な遺伝子異常の蓄積とエピジェネティクス異常が関与している。RET/PTC 遺伝子再構成や BRAF 変異による MAPK 経路の持続活性化は甲状腺発癌の初期イベントと考えられ、TP53 変異や TERT プロモーター変異は高分化癌から未分化癌に至る後期イベントと推定されている。甲状腺癌の腫瘍発生とプログレッションに関与する分子異常が明らかとなる中で、分子生物学的プロファイリングに基づいた甲状腺癌の診断、リスク分類が注目されるようになってきている。本稿では濾胞上皮由来甲状腺腫瘍におけるがんゲノム異常の最新の知見、遺伝子検査導入の展望について解説する。

Key words : Thyroid, Cytology, Cancer Genome, Genetic abnormalities

I. はじめに

HE 染色の開発から約 140 年、パパニコロウ染色の発表から約 80 年が経過した。そして現在に至るまで甲状腺腫瘍は組織と細胞の形態によって定義、分類されている。しかし分子生物学の急速な進歩とがんゲノム異常の解析により、甲状腺腫瘍の組織診断、細胞診断は大きな転換を迎えようとしている。形態学的に乳頭癌と分類される腫瘍は異なる遺伝子異常をもつ腫瘍群から構成されるヘテロな集団である。形態学的な亜型や特殊型には特定の遺伝子異常との相関がある。遺伝子異常の検出によって悪性度や予後を推定することも可能になった。甲状腺細胞診の検体を用いたゲノム解析と診断への応用も実用化されている。本稿では濾胞上皮由来の甲状腺腫瘍におけるゲノム異常について、①がんの発生に関わる異常、②がんの進展、予後に関

わる異常、③細胞診とゲノム解析の 3 つの視点から解説する。

II. がんの発生に関わるゲノム異常

濾胞上皮由来の分化癌は腫瘍細胞の核形態や浸潤性増殖などの組織学的特徴から乳頭癌と濾胞癌に分類されるが、この形態分類は特定の遺伝子変異と相関している (Table 1)¹⁾。乳頭癌と濾胞癌では古典的 MAPK 経路に主要な遺伝子変異が集中しており、BRAF 点突然変異 (BRAFFV600E)、RET 遺伝子再構成 (RET/PTC)、NTRK 遺伝子再構成は乳頭癌に認められる主要な遺伝子変異である。RAS 点突然変異は濾胞型乳頭癌と濾胞癌に認められる。MAPK 経路上の分子ではないが PPAR γ 遺伝子再構成 (PAX8/PPARG) も濾胞癌の遺伝子変異として知られている。これらの遺伝子変異は腫瘍発生と組織型に関わる初期イベントと考えられており、同一の腫瘍に重複して存在せず相互排他的である (Fig. 1, Fig. 2)。

BRAFFV600E 変異は乳頭癌において最も高率 (40~80%) に検出される遺伝子異常である²⁾。BRAF は RAS ファミリーの下流に存在するセリン/スレオニンキナーゼである。1799 番目塩基のチミン (T) がアデニン (A) に置換するトランスバージョン変異によってコドン 600 のバリリン (V) が

Genomic alteration in thyroid tumors

Tetsuo KONDO, M. D., F. I. A. C.

Department of Pathology, University of Yamanashi

論文別刷請求先 〒 409-3898 山梨県中央市下河東 1110 山梨大学医学部人体病理学 近藤哲夫

令和 2 年 8 月 19 日受付

令和 2 年 9 月 2 日受理

Table 1 Genetic abnormalities in follicular cell derived thyroid carcinomas

	PTC	FTC	PDTC	ATC
<i>BRAF</i> mutation (<i>BRAF</i> V600E)	40-80%	0%	5-15%	10-50%
<i>RAS</i> mutation	0-5%	30-50%	20-50%	10-50%
<i>RET</i> rearrangement (<i>RET</i> /PTC)	5-20%	0%	0-10%	0%
<i>NTRK</i> rearrangement	0-5%	0%	0-5%	0-5%
<i>ALK</i> rearrangement	0-5%	0%	0-10%	0-10%
<i>EIF1AX</i> mutation	0-5%	0%	5-15%	5-15%
<i>PIK3CA</i> mutation	0-5%	0-10%	5-20%	10-15%
<i>PPARG</i> rearrangement (<i>PAX8</i> / <i>PPARG</i>)	0%	25-63%	0%	0%
<i>CTNNB1</i> mutation	0%	0%	0-5%	0-5%
<i>TP53</i> mutation	0%	0%	10-35%	40-80%
<i>TERT</i> promoter mutation	5-15%	10-35%	20-50%	10-50%

Abbreviations : PTC : papillary thyroid carcinoma ; FTC : follicular thyroid carcinoma ; PDTC : poorly differentiated thyroid carcinoma ; ATC : anaplastic thyroid carcinoma

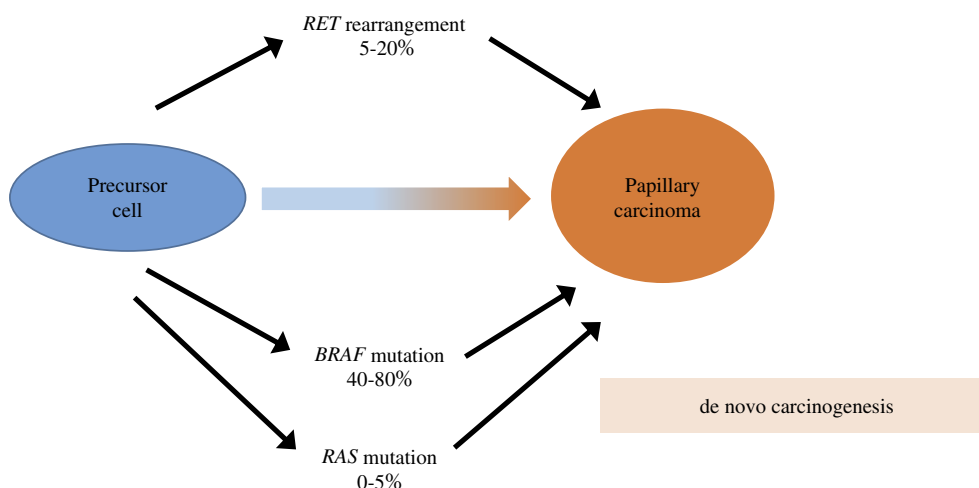


Fig. 1 Genomic alterations in papillary thyroid carcinoma.

グルタミン酸 (E) に変わると *BRAF* が持続的に活性化する。 *BRAF*V600E 変異は成人に発生する乳頭癌の通常型や高細胞型、もしくは高齢の患者により頻度が高い。 *BRAF* 変異陽性の乳頭癌はリンパ節転移、腫瘍再発の頻度がより高く、腫瘍死との相関があることが報告されている³⁻⁵⁾。濾胞癌や良性腫瘍では *BRAF*V600E 変異は認められない。K601 変異や *BRAF* 遺伝子再構成なども報告されているが、甲状腺癌では 90% 以上が V600E 変異である。原因は不明だが乳頭癌における *BRAF* 変異の頻度が世界的に増加傾向にある⁶⁾。V600E 変異特異抗体があり、組織診、細胞診で免疫染色を用いた変異の検出が可能となっている。

RAS 変異 (*NRAS*, *HRAS*, *KRAS*) は乳頭癌の 0~5%、濾胞癌の 30~50% に認められる^{1,2)}。濾胞腺腫や一部の良性腫瘍にも *RAS* 変異がみられる。点突然変異によって 3 つの *RAS* 遺伝子のコドン 12/13 もしくはコドン 61 にミスセ

ンス変異が生じ、変異 *RAS* タンパクが MAPK 経路、PI3K/AKT 経路を持続的に活性化する。最も頻度が高いのは *NRAS*Q61R 変異である⁷⁾。組織学的に濾胞構造パターンを呈する腫瘍と関連があり、通常型乳頭癌では *RAS* 変異がほとんどみられないのに対し、濾胞型乳頭癌では 25~43% と変異の頻度が高くなる^{2,8)}。 *NRAS* 変異を有する濾胞癌は遠隔転移との相関が高い⁷⁾。 *NRAS*Q61R 変異もホルマリン固定パラフィン切片で利用可能な抗体があり、補助診断として利用可能である⁹⁾。

RET 遺伝子再構成 (*RET*/PTC) では 3 末端側に *RET* 遺伝子のチロシンキナーゼと 5 末端側に別の遺伝子が癒合したキメラ遺伝子が形成され、下流の MAPK 経路を持続的に活性化する。5 末端側の遺伝子によって 15 種類以上の *RET*/PTC が報告されているが、乳頭癌で認められる主な *RET* 遺伝子再構成は inv (10) (q11.2 ; q21) による *RET*/

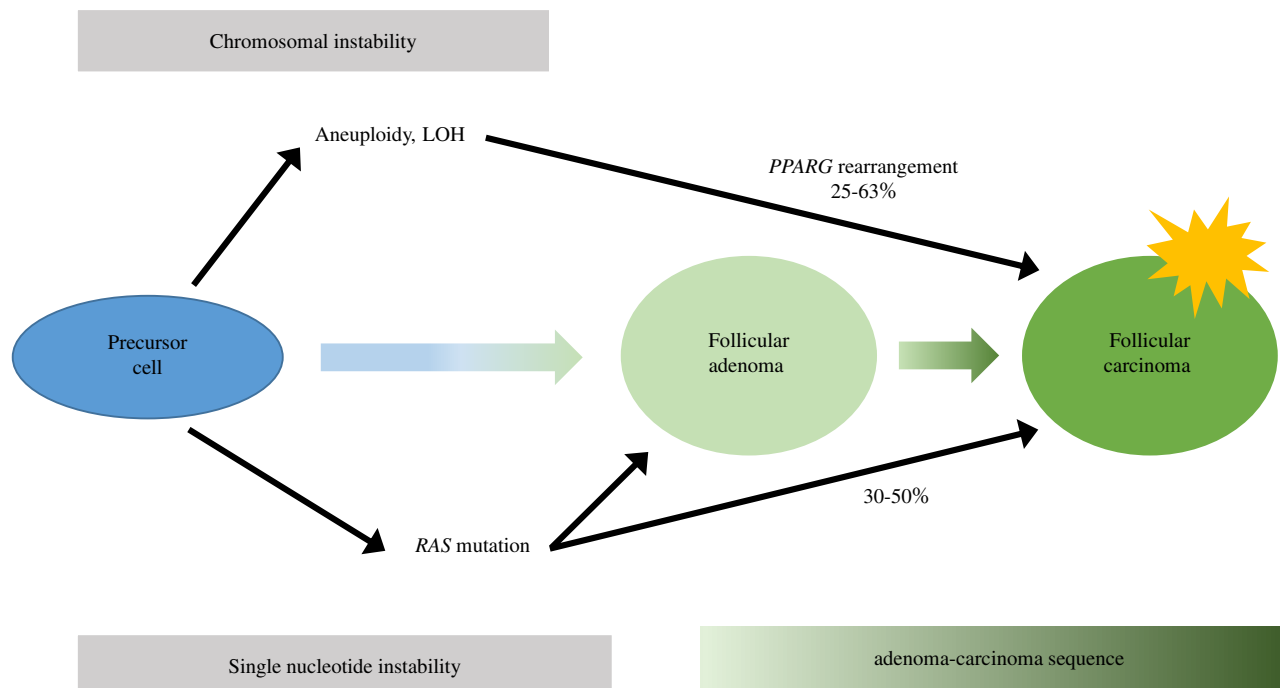


Fig. 2 Genomic alterations in follicular thyroid carcinoma.

PTC1 (*CCDC6/RET*) と *inv* (10) (q11.2;q10) による *RET/PTC3* (*NCOA4/RET*) の2つである¹⁰⁾。

乳頭癌では *RET/PTC* が腫瘍細胞の一部にしか存在しないという非クローナルな現象が知られている。*RET/PTC* 陽性乳頭癌の中で *RET* 遺伝子再構成が確認される癌細胞数の割合は10~54%である¹¹⁾。*RET/PTC* の非クローン性の意義については *RET/PTC* が後期イベントである可能性や腫瘍発生には関与していないパッセンジャー変異である可能性が示唆されている¹¹⁾。

PPARG 遺伝子再構成 (*PAX8/PPARG*) は濾胞癌に検出される融合遺伝子である²⁾。*PAX8* は甲状腺機能分子の発現に関わる転写因子、*PPARG* は脂質代謝に関わる分子であり、*PAX/PPARG* によって腫瘍細胞内に *PPARG* が過剰に発現する。キメラタンパクの機能的な意義については十分には解明されていない。欧米の報告とは異なり日本人の濾胞癌では *PAX8/PPARG* の頻度が極めて低いことが示されている¹²⁾。

III. がんの進展, 予後に関わるゲノム異常

低分化癌と未分化癌も濾胞上皮に由来する腫瘍であり、一部は分化癌のプログレッションによって生じると考えられている²⁾。このプログレッションの過程には *TP53* 変異、テロメラーゼ逆転写酵素 *telomerase reverse transcriptase* (*TERT*) プロモーター変異が関与する (Fig. 3)。

TP53 は p53 をコードするがん抑制遺伝子で、変異や欠失による機能喪失によって細胞周期停止、アポトーシス誘導、DNA 損傷修復が阻害される。低分化癌の10~35%、未分化癌の40~80%に変異が検出される。*TP53* 変異は免疫染色上で核内のびまん性強発現または完全陰性 (null pattern) として認識される¹⁾。

TERT プロモーター変異は2013年に報告された甲状腺癌のゲノム異常である¹³⁾。*TERT* はテロメラーゼ複合体を形成し染色体末端のテロメア伸張に関与している。*TERT* 遺伝子プロモーター領域のDNA変異によって *TERT* 遺伝子の転写が亢進すると、*TERT* 発現量が増加しテロメラーゼが活性化する。乳頭癌の5~15%、濾胞癌の10~35%、低分化癌の20~50%、未分化癌の10~50%に変異が検出されている¹⁾。高齢患者、大きな腫瘍で変異の頻度がより高いこと、分化癌よりも未分化癌での頻度が高いことから甲状腺癌のプログレッションにおける後期イベントと推定されている。

IV. 細胞診とゲノム解析

現在、乳頭癌ゲノムのほぼ全容が明らかとなっている¹⁴⁾。乳頭癌に対して全ゲノム、RNA、miRNAのシーケンス解析、SNPアレイ解析、DNAメチル化アレイ解析、逆相タンパク質アレイ解析が網羅的、統合的に行われ、それまで未知であった新規の遺伝子変異や融合遺伝子が多数

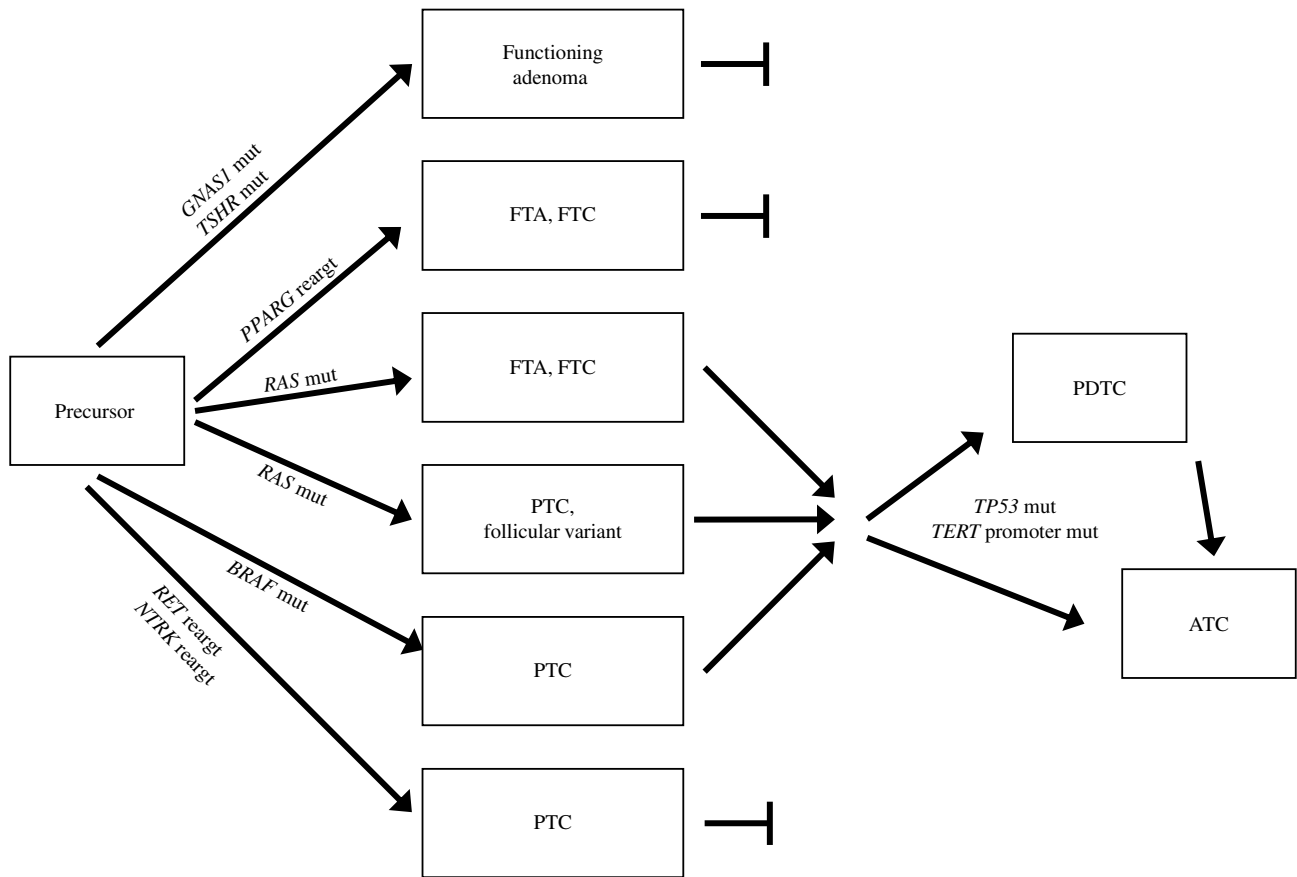


Fig. 3 Multistep carcinogenesis model for thyroid carcinoma.

Abbreviations : mut : mutation ; reargt : rearrangement ; FTA : follicular thyroid adenoma ; FTC : follicular thyroid carcinoma ; PTC : papillary thyroid carcinoma ; PDTC : poorly differentiated thyroid carcinoma ; ATC : anaplastic thyroid carcinoma

発見された。低分化癌と未分化癌での網羅的ゲノム解析も進み、ATM, CHEK2, MUTHY の新規変異が発見されている¹⁵⁾。

ゲノム解析データを基に遺伝子群を選択したターゲットリシーケンス（次世代シーケンス技術）が甲状腺腫瘍の術前診断に実用化されている。ThyroSeq は甲状腺細胞診検体に対して開発されたゲノム診断検査であり、最新の v3 版では 12000 以上の変異スポット、150 以上の融合遺伝子を含む 112 遺伝子をターゲットにしている。ThyroSeq v3 で細胞診検体を解析すると感度 94%、特異度 89%、正診率 92% で良性と悪性を判別することができる¹⁶⁾。術前細胞診の診断精度が高まり甲状腺結節に対する手術の要、不要をよりの確に選択することが可能となっている¹⁷⁾。甲状腺細胞診検体を用いたゲノム検査には ThyroSeq 以外にも Thy-GeNeXT/ThyraMIR, Afirma GSC がある¹⁸⁾。甲状腺細胞診の報告様式であるベセスダシステム第 2 版では、意義不明や濾胞性腫瘍の診断カテゴリーに対する臨床的管理方法として遺伝子検査を挙げている。本邦においては甲状腺細胞診に対する遺伝子検査は日常診療として導入されていない

が、細胞診に遺伝子検査が併用される、さらには遺伝子検査を主目的とした細胞診が行われるのは時間の問題であろう。

V. ま と め

甲状腺癌のゲノム異常は基礎研究から臨床応用へと転換しつつある。次世代シーケンスを含めたオミックス解析は臨床病理学的因子との関連、新規発見された遺伝子異常の機能解析、分子病理診断への応用、治療標的探索などさらに展開されていくと予想される。

著者は開示すべき利益相反はありません。

Abstract

Thyroid cancer is the most commonly encountered endocrine malignancy in clinical practice, ranging from indolent well-differentiated carcinomas (papillary thyroid carcinoma and follicular thyroid carcinoma)

to aggressive poorly differentiated thyroid carcinoma, and lethal undifferentiated (anaplastic) carcinoma. Recent advances in the field of molecular biology enable assessment of histology-specific gene expressions and genetic abnormalities. Based on these evidences, molecular testing is now considered as one of the useful ancillary tools for the cytopathology of thyroid tumors.

文 献

- 1) 大石直輝, 近藤哲夫. 甲状腺癌のゲノム異常・エピゲノム異常 病理と臨 2020 ; 38 : 147-155.
- 2) Kondo, T., Asa, S. L., Ezzat, S. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 292-306.
- 3) Xing, M., Westra, W. H., Tufano, R. P., Cohen, Y., Rosenbaum, E., Rhoden, K. J., et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90 : 6373-6379.
- 4) Elisei, R., Ugolini, C., Viola, D., Lupi, C., Biagini, A., Giannini, R., et al. BRAF (V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma : a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 ; 93 : 3943-3949.
- 5) Elisei, R., Viola, D., Torregrossa, L., Giannini, R., Romei, C., Ugolini, C., et al. The BRAF (V600E) mutation is an independent, poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroid papillary thyroid carcinoma : single-institution results from a large cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 ; 97 : 4390-4398.
- 6) Vuong, H. G., Altibi, A. M. A., Abdelhamid, A. H., Ngoc, P. U., Quan, V. D., Tantawi, M. Y., et al. The changing characteristics and molecular profiles of papillary thyroid carcinoma over time : a systematic review. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 10637-10649.
- 7) Fukahori, M., Yoshida, A., Hayashi, H., Yoshihara, M., Matsukuma, S., Sakuma, Y., et al. The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors : new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid* 2012 ; 22 : 683-689.
- 8) Zhu, Z., Gandhi, M., Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003 ; 120 : 71-77.
- 9) Oishi, N., Kondo, T., Vuong, H. G., Nakazawa, T., Mochizuki, K., Kasai, K., et al. Immunohistochemical detection of NRAS (Q61R) protein in follicular-patterned thyroid tumors. *Hum Pathol* 2016 ; 53 : 51-57.
- 10) Nakazawa, T., Kondo, T., Kobayashi, Y., Takamura, N., Murata, S., Kameyama, K., et al. RET gene rearrangements (RET/PTC1 and RET/PTC3) in papillary thyroid carcinomas from an iodine-rich country (Japan). *Cancer* 2005 ; 104 : 943-951.
- 11) Nakazawa, T., Murata, S., Kondo, T., Niu, D., Mochizuki, K., Kawasaki, T., et al. RET/PTC rearrangements arising from a small population of papillary thyroid carcinoma cells, possible candidate for passenger mutation. *Virchows Arch* 2009 ; 455 : 35-41.
- 12) Mochizuki, K., Kondo, T., Oishi, N., Tahara, I., Inoue, T., Kasai, K., et al. Low frequency of PAX8-PPARGgamma rearrangement in follicular thyroid carcinomas in Japanese patients. *Pathol Int* 2015 ; 65 : 250-253.
- 13) Vinagre, J., Almeida, A., Populo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 2185.
- 14) The-Cancer-Genome-Atlas-Research-Network Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014 ; 159 : 676-690.
- 15) Sykorova, V., Dvorakova, S., Vcelak, J., Vaclavikova, E., Halkova, T., Kodetova, D., et al. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing. *Anticancer Res* 2015 ; 35 : 2029-2036.
- 16) Nikiforova, M. N., Mercurio, S., Wald, A. I., Barbi de Moura, M., Callenberg, K., Santana-Santos, L., et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer* 2018 ; 124 : 1682-1690.
- 17) Nikiforov, Y. E., Baloch, Z. W. Clinical validation of the ThyroSeq v3 genomic classifier in thyroid nodules with indeterminate FNA cytology. *Cancer Cytopathol* 2019 ; 127 : 225-230.
- 18) Nishino, M., Krane J. F. Role of Ancillary Techniques in Thyroid Cytology Specimens. *Acta Cytol* 2020 ; 64 : 40-51.

特集

甲状腺細胞診報告様式ベセスダシステムの評価

坂本 穆彦

大森赤十字病院検査部

甲状腺細胞診報告様式としてはベセスダシステムが国際的に用いられているが、わが国の甲状腺腫瘍診療にとっては必ずしもすべてを容認できる内容ではない。特に現行のベセスダシステムは、米国の医療事情を色濃く反映した WHO 甲状腺腫瘍組織分類の考えをそのまま踏襲している。すなわち、米国では細胞診で悪性と判定されると、標準的治療として甲状腺全摘と追加として放射線療法がすすめられる。この中には過剰手術症例が含まれているとされ、それを避けるために WHO 分類に新たに境界病変が設けられた。ところが、わが国では過剰治療は問題になっていない。さらに、細胞診では境界病変の判定は困難である。このような医療事情を背景にして「甲状腺癌取り扱い規約」第 8 版（2019 年）では WHO 分類の境界病変は採用されなかった。それに連動してベセスダシステムの説明内容も、境界病変に関する事項は同様に扱われることになった。国際的に広く流布しているというだけの理由で盲目的にベセスダシステムの記載を受け入れるのではなく、わが国の医療の実情にはどれが最もふさわしいかという観点からの考慮は重要である。

Key words : Thyroid, Cytology, Reporting system, The Bethesda System, General Rules for the Description of Thyroid Cancer

I. はじめに

甲状腺細胞診報告様式ベセスダシステム (The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, 以下、甲状腺ベセスダシステムと略称) は、2009 年に初版^{1,2)}が、2017 年に第 2 版³⁾が公にされた。その後、おのおのの版の解説アトラス^{4,5)}が主導者によって刊行され、それらの和訳本^{6,7)}も出版された。

ベセスダシステムの名を冠した細胞診報告様式は、子宮頸部 (1988 年) に次いでのものであり、いずれも米国メリーランド州ベセスダにある国立癌研究所 (National Can-

cer Institute : NCI) で開催された会議によって決定されたので、この地名を報告様式の名称に取り入れている。

甲状腺ベセスダシステムは、子宮頸部のベセスダシステムが採用した、それ以前にはなかった新しい視点を取り込んでいる。具体的には、パパニコロウ分類との訣別、検体の適否の明記が挙げられる。他方、腫瘍ないし腫瘍関連病変の推定診断名は、WHO 甲状腺腫瘍組織分類 第 4 版⁸⁾をそのまま受け入れている。

本稿では甲状腺ベセスダシステムの優れている点と問題点を明らかにすることにより、わが国の医療の立場からみた甲状腺ベセスダシステムの評価について述べたい。甲状腺ベセスダシステムに続いて、尿細胞診パリシステム⁹⁾、唾液腺細胞診ミラノシステム¹⁰⁾も公刊された。これらに共通するのは、各臓器に限定された独自の報告様式というスタイルであり、甲状腺ベセスダシステムの評価の過程における論考は、それぞれの臓器の報告様式を考えるうえでも有益な示唆を与えうると思われる。

An evaluation of The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology

Atsuhiko SAKAMOTO, M. D., F. I. A. C.

Department of Pathology and Laboratory Medicine, Omori Red Cross Hospital

論文別刷請求先 〒143-8527 東京都大田区中央 4 の 30 の 1 大森赤十字病院検査部 坂本穆彦

令和 2 年 7 月 8 日受付

令和 2 年 7 月 16 日受理

Table 1 Reporting Format of General Rules for the Description of Thyroid Cancer, 6th ed. (2005)

Diagnostic Categories
Inadequate
Adequate
Normal or Benign
Indeterminate
Malignancy suspected
Malignant

Table 3 Comparison of thyroid cytopathology reporting formats

General Rules for the Description of Thyroid Cancer 6th ed (2005)	The Bethesda System (2008)
Inadequate	Nondiagnostic or Unsatisfactory
Normal or Benign	Benign
Indeterminate	AUS/FLUS FN/SF
Malignancy suspected	Suspicious for Malignancy
Malignant	Malignant

II. “鑑別困難”の導入

甲状腺細胞診では多くの他領域と同様、かつてはパパニコロウ (Papanicolaou) 分類 (クラス [class] 分類) や 3 段階分類 (陰性: negative, 疑陽性: suspicious, 陽性: positive) が用いられていた。

しかし、Papanicolaou Society of Cytopathology は、甲状腺領域独自の判定区分を提唱した¹¹⁾。その特徴は、クラス III や疑陽性に相当する診断困難症例を“鑑別困難 (Indeterminate)”として一括したことにある。“鑑別困難”というカテゴリーには極めて多彩な病変が含まれるが、これにより良性・悪性・悪性の疑い以外の症例が一つの判定区分にまとめられた。

わが国の「甲状腺癌取扱い規約」(General Rules for the Description of Thyroid Cancer) (以下、「取扱い規約」) 第 6 版¹²⁾では、判定区分の設定にあたり、“鑑別困難”という用語とその内容説明を取り入れた報告様式を採用した (Table 1)。

この判定区分は同時期に改定作業を進めていた「乳癌取扱い規約」¹³⁾の病理委員会との合同の会議で甲状腺、乳癌の報告様式の調整を行い、両領域は同一の判定区分を用いることを合意した。乳癌の穿刺吸引細胞診が極めて盛んなわが国においては、甲状腺でも乳癌と同一の判定区分が用いられれば、甲状腺穿刺吸引細胞診のさらなる普及を図るためにも有意義だろうと考えられた¹⁴⁾。

Table 2 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (2008, 2017)

Diagnostic Categories
I. Nondiagnostic or Unsatisfactory
II. Benign
III. Atypia of Undetermined Significance (AUS) or Follicular Lesion of Undetermined Significance (FLUS)
IV. Follicular Neoplasm (FN) or Suspicious for a Follicular Neoplasm (SFN)
V. Suspicious for Malignancy (SFM)
VI. Malignant

III. 甲状腺ベセスダシステム初版の登場

前述のように、2008 年のベセスダでの会議で決められた甲状腺ベセスダシステム初版^{1,2)}がその翌年に公表された (Table 2)。

そこには今までの甲状腺細胞診にはない新しい内容が盛り込まれた。

- (1) いわゆる“鑑別困難”を 2 分した。
 - ・意義不明な異型あるいは意義不明な濾胞性病変 (atypia of undetermined significance : AUS/follicular lesion of undetermined significance : FLUS)
 - ・濾胞性腫瘍あるいは濾胞性腫瘍の疑い (follicular neoplasm : FN/suspicious for a follicular neoplasm : SFN)
- (2) 判定区分ごとに癌の危険度を数値で示した。
- (3) 判定区分ごとに推奨すべき臨床的対応を示した。

特に“鑑別困難”が 2 分され、AUS/FLUS は異型細胞が乳頭癌、濾胞性腫瘍、髄様癌、リンパ腫などの判別が難しい症例、FN/SFN は小濾胞構造をもつ症例で、濾胞癌か濾胞腺腫かのいずれかと想定されるものとされた。

Table 3 では、「取扱い規約」と甲状腺ベセスダシステムの判定区分の対比が示されている。「取扱い規約」第 6 版¹²⁾の“鑑別困難”は、同第 7 版¹⁵⁾では判定区分を甲状腺ベセスダシステムと同様なものに変更された。この変更は甲状腺ベセスダシステムの先見性を認めた結果であり、わが国では甲状腺領域を専門とする細胞診専門医にも甲状腺外科医にも高く評価された。

IV. 甲状腺ベセスダシステム第 2 版における変更点

甲状腺ベセスダシステム第 2 版^{3,7)}は、WHO 甲状腺腫瘍組織分類 第 4 版 (2017 年)⁸⁾の内容を全面的に取り入れて改訂を加え、2018 年に公表された。それによれば、WHO 組織分類が新しく提唱した境界病変 (Table 4) が、各判定

Table 4 Newly proposed border-line lesions of the thyroid for inclusion in the WHO Histological Classification of Thyroid Tumours (2017)

<ul style="list-style-type: none"> ・ Follicular tumor of uncertain malignant potential : FT-UMP ・ Well-differentiated tumor of uncertain malignant potential : WDT-UMP ・ Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features : NIFTP
--

区分の説明中の推定診断の対象として取り上げられた。そのため説明文の記述量が増加した。さらに、境界病変を取り入れたことにより、乳頭癌の細胞診断に難しい問題を投げかけることになった。特に「乳頭癌様核所見を伴う非浸潤性濾胞型腫瘍 (noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features : NIFTP) は、乳頭癌様の核をもつことが条件なので、従来の基準では乳頭癌と判定されたものの中に含まれることになる。NIFTPの存在を認めると、細胞診では乳頭癌かNIFTPかの判別は事実上困難である。

細胞診判定の立場からは、境界病変導入は乳頭癌の診断に不要な混乱を持ち込むことが危惧され、わが国の「取扱い規約」第8版¹⁶⁾(2019年)では正式採用は見送られた。わが国の甲状腺外科医からは甲状腺腫瘍に境界病変を導入する利点はなく、むしろ臨床的にも混乱を招くだけであるとの見解が寄せられ、病理サイドの決定が支持された。

WHO 甲状腺腫瘍組織分類 第4版に境界病変が取り上げられた背景には、米国における甲状腺癌患者の過剰手術を抑制したいという考えがあるといわれている。米国では甲状腺穿刺吸引細胞診で悪性と判定されると、標準的な治療として甲状腺全摘と放射線治療の追加が推奨される^{17,18)}。ところがわが国では細胞診で悪性と判定されても、手術から経過観察まで甲状腺癌の治療法・対処法にはいくつかの選択肢がある^{19,20)}。このためにわが国では甲状腺癌の過剰手術は問題視されていない。

このほか、甲状腺ベセスダシステム 第2版には、分子レベルの検索を要請するなど、これまでにない新しい記述がなされている。

V. 「取扱い規約」第8版と甲状腺ベセスダシステム第2版の主な相違点

1. 検体の適正・不適正と濾胞液の扱い

「取扱い規約」の検体適正・不適正の基準は Table 5 のごとくである。すなわち、適正とは下記4項目のいずれか1つを満たすものとする。

①10個程度の濾胞上皮細胞からなる集塊が6個以上認めら

れる。

②豊富なコロイドが認められる。

③異型細胞が出現している。ただし、細胞数は問わない。

④リンパ球、形質細胞、組織球などの炎症細胞が認められる。不適正とは下記2項目のいずれかの場合をいう。

①標本作製不良(乾燥、変性、固定不良、末梢血混入、塗抹不良など)。

②適正の項目のいずれにも該当しない。

適正項目④にあるように、「取扱い規約」では炎症細胞のみの症例も適正と判断される。濾胞液のみの検体にも泡沫細胞は含まれるので、この基準によれば適正である。

他方、甲状腺ベセスダシステムでは濾胞液のみの検体は不適正とされ、再検査が促される。濾胞形成性乳頭癌の可能性があるからという理由である。なお、わが国での検討では濾胞液のみの症例の悪性危険度は、検体不適正例よりも低く、良性例とほぼ同等であるとの結果を得ている^{21,22)}。このため、「取扱い規約」では濾胞液を検体適正と位置付けた。ただし、甲状腺ベセスダシステムによる判定結果と対比する際の便宜を考慮し、「濾胞液」を独立した判定区分として設定した (Table 6)。

2. 乳頭癌の核所見がみられる濾胞性病変の判定区分について

濾胞状配列を示す標本で、核腫大、核形不整、淡明なクロマチンのような乳頭癌を疑う軽度の核所見がみられる場合は、甲状腺ベセスダシステムでは濾胞性腫瘍に分類することをすすめているが、「取扱い規約」では意義不明もしくは悪性の疑いに分類される。

3. 悪性の危険度と推奨する臨床的対応

甲状腺ベセスダシステムでは、悪性の危険度と推奨する臨床的対応が記載されている。しかしわが国と欧米では各腫瘍の頻度、切除の適応、社会的状況が異なる。そのため、それらの基準をわが国にそのまま導入することは困難である。したがって、「取扱い規約」では悪性の危険度と推奨する臨床的対応には言及していない。

VI. 学会内での議論とそのゆくえ

日本甲状腺外科学会(現・日本内分泌外科学会)および日本甲状腺病理学会では、関連の委員会を中心に、WHO甲状腺腫瘍組織分類および甲状腺ベセスダシステムへのわが国としての対応を検討してきた。筆者もそのメンバーの1人として委員会に参画する機会を得た。

WHOより新しく提唱された甲状腺境界病変に関しては、臨床的にその導入がわが国の甲状腺診療の内容を高めるものではなく、むしろ混乱を招く危険性が強く示唆され

Table 5 Criteria for Adequate and Inadequate specimens (General Rules for the Description of Thyroid Cancer 7th ed. and 8th ed.)

Adequate (corresponding to at least 1 of the following 4 items)

- ・ More than six groups of well-preserved, well-stained follicular cell groups with ten cells each.
- ・ Abundant colloid.
- ・ Significant cytologic atypia. No minimum number of follicular cells is required.
- ・ Inflammatory cells including lymphocytes, plasma cells, and histiocytes. Cyst fluid with inflammatory cells and without follicular cells.

Inadequate (corresponding to at least 1 of the following 2 items)

- ・ Poorly prepared, poorly stained, or significantly obscured follicular cells.
- ・ Specimen not corresponding to any of the criteria for adequate specimens.

Table 6 Reporting Format of General Rules for the Description of Thyroid Cancer, 7th ed. (2015) and 8th ed. (2019)

Diagnostic Categories
Unsatisfactory
Cyst fluid
Benign
Undetermined significance
Follicular neoplasm
Suspicious for malignancy
Malignant

た。境界病変を取り入れたベセスダシステム第2版をそのまま運用すると、乳頭癌に関連する細胞診の判定の客観性が保てないという危惧も明らかになった。

以上より、甲状腺ベセスダシステムに対する評価は、次のようにまとめることができよう²³⁾。

すなわち、ベセスダシステム初版で新しく提示された AUS/FLUS および FN/SFN という判定区分はそれまでのわが国の“鑑別困難”よりも優れているという理解は容易に得られ、「取扱い規約」の改訂とともにそのまま採用された。このことで甲状腺ベセスダシステムは高く評価された。

しかしながら、甲状腺ベセスダシステム 第2版では甲状腺境界病変を認めたため、細胞診断に混乱を持ち込むこととなった。この点に関して、わが国では細胞診専門医も甲状腺外科医も境界病変を否定的に捉えるという立場が優勢を占め、ベセスダシステムの内容はそのままでは受け入れられないこととなった。

このような評価をもとに「取扱い規約」第8版¹⁶⁾は刊行された。

VII. おわりに

甲状腺ベセスダシステムと「取扱い規約」の成り立ちと、その後の経緯につき概略を記した。

甲状腺領域では、「取扱い規約」作成にあたっては常にわが国の甲状腺腫瘍の診療にとって適切か否かという観点を

重視してきた。主な検討対象としては WHO 甲状腺腫瘍組織分類と甲状腺ベセスダシステムである。これらは組織診・細胞診の国際スタンダードとして流布している。しかしながら、これらに盲従することなく、是々非々の立場でわが国の診療に有益な内容を構築してゆくという方針が今後とも維持されることが望ましいと考えられる²⁴⁾。

筆者には開示すべき利益相反状態はありません。

本論文の要旨は、第61回日本臨床細胞学会総会春期大会(2020年、Web開催)のシンポジウム「甲状腺細胞診—さらなる発展への展望—」にて発表した。

Abstract

The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology was revised according to the new proposal to include thyroid border-line lesions in the WHO Histological Classification of Thyroid Tumours (2017). This proposal was made with objective of allowing unnecessary surgeries to be avoided in thyroid cancer patients. In the United States, every patient with a malignant cytodiagnosis is generally advised to undergo total thyroidectomy and additional postoperative radiotherapy. However, unnecessary surgeries are avoided in Japan, because several treatment choices are available for the treatment of thyroid cancer. Therefore, Japanese medical associations concerned with thyroid surgery and pathology have not accepted this newly proposed category of border-line lesions, and have also refused to accept the explanatory note for border-line lesions provided in the revised Bethesda System. We believe that the basic principle of diagnosis and treatment is a discussion about what would be the best policy in daily medical practice.

文 献

- 1) Cibas, Es., Ali, S. Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2009 ; 19 : 1159-1165.
- 2) Cibas, Es., Ali, S. Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009 ; 132 : 658-665.
- 3) Cibas, Es., Ali, S. Z. The 2017 Bethesda System for Reporting

- Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2017 ; 27 : 1341-1346.
- 4) Ali, S. Z., Cibas, E. S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology : Definitions, Criteria and Explanatory Notes. New York : Springer : 2009.
 - 5) Ali, S. Z., Cibas, E. S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology : Definitions, Criteria and Explanatory Notes. 2nd ed. New York : Springer : 2018.
 - 6) 坂本穆彦, 監訳. 甲状腺細胞診ベセスダシステム. 東京 : シュプリンガー・ジャパン ; 2011.
 - 7) 坂本穆彦, 監訳. 甲状腺細胞診報告様式ベセスダシステム 第2版. 東京 : 丸善出版 ; 2019.
 - 8) Lloyd, R. V., Osamura, R. Y., Klöpel, G. WHO classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon : IARC ; 2017.
 - 9) Rosenthal, D. L., Wojeik, E. M., Kurtycz, D. F. I. The Paris System for Reporting Urinary Cytology. Switzerland : Springer : 2016.
 - 10) Faquin, W. C., Rossi, E. D. The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology. Switzerland : Springer ; 2018.
 - 11) 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 specimens from thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 1996 ; 15 : 84-89.
 - 12) 甲状腺外科研究会. 甲状腺癌取扱い規約 第6版. 東京 : 金原出版 ; 2005.
 - 13) 日本乳癌学会. 乳癌取扱い規約 第15版. 東京 : 金原出版 ; 2004.
 - 14) 坂本穆彦. 細胞診報告様式の変遷と「癌取扱い規約」. *日臨細胞会誌* 2020 ; 59 : 263-268.
 - 15) 日本甲状腺外科学会. 甲状腺癌取扱い規約 第7版. 東京 : 金原出版 ; 2015.
 - 16) 日本内分泌外科学会・日本甲状腺病理学会. 甲状腺癌取扱い規約 第8版. 東京 : 金原出版 ; 2019.
 - 17) Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009 ; 19 : 1167-1214.
 - 18) Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016 ; 26 : 1-133.
 - 19) 日本内分泌外科学会, 日本甲状腺外科学会. 甲状腺腫瘍診療ガイドライン 2010年版. 東京 : 金原出版 ; 2010.
 - 20) 日本乳腺甲状腺超音波医学会・甲状腺用語診断基準委員会. 甲状腺超音波診断ガイドブック 改訂第2版. 東京 : 南江堂 ; 2012.
 - 21) Takada, N., Hirokawa, M., Suzuki, A., Higuchi, M., Kuma, S., Miyachi, A. Reappraisal of “cyst fluid only” on thyroid fine-needle aspiration cytology. *Endocrine J* 2017 ; 64 : 759-765.
 - 22) Kanematsu, R., Hirokawa, M., Higuchi, M., Suzuki, A., Aga, H., Tanaka, A., et al. Risk of malignancy and clinical outcomes of cyst fluid only nodules in the thyroid based on ultrasound and aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2020 ; 48 : 30-34.
 - 23) 坂本穆彦, 編・著. 甲状腺細胞診アトラス. 報告様式運用の実際. 東京 : 医学書院 ; 2019.
 - 24) 坂本穆彦. 細胞診報告様式. *病理と臨* 2013 ; 31 : 63-71.

公益社団法人日本臨床細胞学会雑誌投稿規定

1. 投稿資格

筆頭著者及び投稿者は日本臨床細胞学会会員に限る。

2. 掲載論文

- 1) 論文の種別は総説, 原著, 調査報告, 症例報告, 特集, 短報, 編集者への手紙 (Letter to the Editor), 読者の声である。(依頼原稿については後述)
- 2) 投稿論文は臨床細胞学の進歩に寄与しうるもので, 他誌に発表されていないものに限る (10章にて詳述)。
- 3) 論文作成に際しては, プライバシー保護の観点も含め, ヘルシンキ宣言 (ヒトにおける biomedical 研究に携わる医師のための勧告) ならびに「人を対象とする医学研究に関する倫理指針」(文部科学省, 厚生労働省 (平成26年12月22日, 平成29年2月28日一部改正) <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-12600000-Seisakutoukatsukan/0000168764.pdf>) が遵守されていること。
※これらの指針は, 学会誌各年1号に記載。
- 4) 論文の著作権は本学会に帰属し, 著者は当学会による電子公開を承諾するものとする。セルフ・アーカイブ(自身のホームページ, 所属機関のリポジトリなど)においては表題, 所属, 著者名, 内容要旨の公開は学会誌の発行の後に認められる。
- 5) 論文投稿に際し, 著者全員の利益相反自己申告書(様式2)を添付すること。なお, 書式は<http://www.jssc.or.jp/coi/>からダウンロードして用い, 署名欄には自署する。この様式2に記載した利益相反の内容は論文末尾, 文献の直前の場所に記される。規定された利益相反状態がない場合は, 同部分に, 「筆者らに, 開示すべき利益相反状態はありません。」などの文言を入れる。

3. 投稿形式

- 1) 電子投稿とする。
- 2) 電子投稿の際には, 以下のサイトからアクセスする。
<https://www.editorialmanager.com/jjssc/>

4. 執筆要項

- 1) 文章と文体
 - (1) 用語は和文または英文とする。
 - (2) 平仮名, 常用漢字, 現代仮名づかいを用いる。ただ

し, 固有名詞や一般に用いられている学術用語はその限りではない。

- (3) 度量衡単位は cm, mm, μm , cm^2 , ml, l, g, mg など CGS 単位を用いる。
 - (4) 外国人名, 適当な和名のない薬品名, 器具及び機械名, または疾患名, 学術的表現, 科学用語については原語を用いる。大文字は固有名詞及びドイツ語の名詞の頭文字に限る。英文での投稿原稿の場合も和文の場合に準ずる。
 - (5) 医学用語は日本臨床細胞学会編集の「細胞診用語解説集」(<http://jssc.or.jp/wp-content/uploads/2015/05/kaisetsu.pdf>) に準拠すること。また, その略語を用いても良いが, はじめに完全な用語を書き, 以下に略語を用いることを明らかにする。
- 2) 原稿の書き方
本誌電子投稿サイトの指示に従う (<https://www.editorialmanager.com/jjssc/>)。
- 3) 電子ファイル
以下の電子ファイル形式を推奨する。
表題ページ, 本文, 図, 表の説明 (Figure legend), 参考文献: Word, RTF, TXT
図: TIFF, JPEG, PDF
表: Excel
なお, 図 (写真を含む) の解像度は, 雑誌掲載サイズで 300dpi 以上が目安である。
- 4) 総説・原著・調査報告・症例報告・短報論文の様式
- (1) 構成
タイトルページ, 内容要旨, 索引用語 (key words), 本文, 利益相反状態の記載 (様式2の内容は論文末尾に添付する), 英文要旨, 文献, 図及び表の説明, 図, 表の順とする。原稿には通し頁番号をふる。タイトルページ (1枚目) には, 当該論文における修正稿回数 (初回, 修正1など), 論文の種別 (原著, 症例報告, 短報など), 和文の表題 (50字以内), 著者名, 所属のほかに論文別刷請求先, 著作権の移譲と早期公開に対する同意を明記する。
2枚目には内容要旨, 索引用語を記載する。本文は内容要旨とは別に始める。
 - (2) 著者
著者名は直接研究に携わった者のみに限定する。著

者数は以下のとおりとし、それ以外の関係者は本文末に謝辞として表記されたい。

- 原著：12名以内
- 調査報告：10名以内
- 症例報告：10名以内
- 短報：6名以内
- 編集者への手紙：6名以内
- 総説：1名を原則とする

(3) 内容要旨

編集者への手紙を除いて500字以内（短報は300字以内）にまとめ、以下のような小見出しをつける。

- 原著と調査報告：目的、方法、成績、結論
- 症例報告：背景、症例、結論
- 短報：原著または症例報告に準ずる
- 総説と特集：論文の内容に応じて適宜設定

(4) 索引用語

論文の内容を暗示する英語の単語（Key words）を5語以内で表示する。原則として、第1語は対象、第2語は方法、第3語以下は内容を暗示する単語とする。

key words 例：

胆嚢穿刺吸引細胞診—胆嚢癌4例の細胞像と組織像—

Gallbladder, Aspiration, Cancer, Morphology
肝細胞癌についての1考察

Hepatocellular carcinoma, Morphology, Review
喀痰中に卵巣明細胞腺癌細胞が見出されたまれな1例

Clear cell adenocarcinoma, Cytology, Sputum,
Metastasis, Case report

(5) 本文及び枚数制限

a. 原著・総説・調査報告

本文、文献を含め10,000字以内（おおむねA4判20頁程度）とする。

表は、10枚以内とする。

図（写真を含む）の枚数に制限はないが、必要最小限の枚数とする。

b. 症例報告

本文、文献を含め6,000字以内（おおむねA4判12頁程度）とする。

表は、5枚以内とする。

図（写真を含む）に制限はないが、必要最小限の枚数とする。

c. 短報

文字数を3000字以内とする。

図は4枚以内、表は計1枚までとする。

d. 編集者への手紙

本誌に掲載された論文に関する手紙形式の短い論文（追加検討、著者への質問、論文に関連する問題提起など）を、編集者への手紙の形で受け付ける。見出し等の形式は定めない。図は2枚以内、引用文献は6編以内、著者は6名以内、要旨は不要、刷り上がりは概ね2ページ以内とする。

(6) 英文要旨

本文とは別紙に、表題の英訳及びローマ字つづりの著者名、所属の英文名、及び要旨内容を記す。

著者名のあとに、以下の略号を用いてそれぞれの称号あるいは資格を付記する。

医師：M.D., M.D., M.I.A.C. あるいはM.D., F.I.A.C.
歯科医師：D. D. S. とし、それ以外の称号あるいは資格は医師と同様に付記する。

臨床検査技師：M. T., C. T., J. S. C., C. T., I. A. C., C. T., C. M. I. A. C., C. T., C. F. I. A. C.などを記載する。

要旨内容は英語で200語以内（ただし表題、著者名、所属名は除く）とし、以下のような小見出しをつけてまとめる。

原著と調査報告：Objective, Study Design, Results, Conclusion

症例報告：Background, Case（またはCases), Conclusion

総説：論文の内容に応じて適宜設定

短報：小見出しをつけずに100語以内にまとめる

(7) 文献

a. 主要のものに限る。

原著・特集・調査報告：30編以内

症例報告：15編以内

短報：10編以内

編集者への手紙：6編以内

総説：特に編数の制限を定めない

b. 引用順に並べ、本文中に肩付き番号を付す。

c. 文献表記はバンクーバー・スタイルとし、誌名略記について和文文献は医学中央雑誌刊行会、英文文献はIndex Medicusに準ずる。参考として以下に例を記載する。

【雑誌の場合】

著者名（和名はフルネームで、欧文名は姓のみをフルスペル、その他はイニシャルのみで3名まで表記し、3名をこえる場合はその後を“・ほか”、“et al”と略記する）。表題（フルタイトルを記

載). 雑誌名 発行年 (西暦); 巻: 頁-頁. (電子版のみ公開の時点及び doi のみの文献では, doi でも良い)

【単行本の場合】

著者名, 表題, 出版社名, 出版社所在都市名, 発行年 (西暦).

なお, 引用が単行本の一部である場合には表題の次に編者名, 単行本の表題を記し, 出版社名, 出版社所在都市名, 発行年, 頁-頁.

(8) 図 (写真を含む)・表

- a. 図, 表及びそれらの説明 (legend) に用いる文字は英文で作成する. 図, 表は Fig.1, Table 1 などのようにそれぞれの番号をつけ, 簡単な英文のタイトルと説明を付記する.
- b. 本文中には図, 表の挿入すべき位置を明示する.
- c. 顕微鏡写真には倍率を付する. 顕微鏡写真 (細胞像, 組織像) の倍率は撮影時の対物レンズ倍率を用いるが, 写真へのスケールの挿入が好ましい. 顕微鏡写真については撮影時の倍率を表示するか, または写真にスケールを入れる.
- d. 他者の著作物の図表を論文中で使用する場合は, 著作権者より投稿論文を電子公開することを含めた許諾が必要で, これを証明する書類を添付する.

5) 特集論文の様式

一つのテーマのもとに数編の論文 (原著ないし総説) から構成される. 特集企画者は, 特集全体の表題 (和文及び英文) 及び特集の趣旨 (前書きに相当) を 1,200 字以内にまとめる. 原稿の体裁は原著・総説に準じる.

6) 読者の声

以上の学術論文に該当しないもので, 本誌掲載論文に関する意見, 本学会の運営や活動に関する意見, 臨床細胞学に関する意見を掲載する. ただし, 他に発表されていないものに限る. 投稿は以下の所定の書式・手順による.

- (1) 表題は和文 50 字以内とする. 表題に相当する英文も添える. 改行して本文を記述する.

末尾に著者名 (資格も付記), 所属施設名, 住居の和文及び英文を各々別行に記す. 著者は 1 名を原則とする. 文献は文末に含めることができるが, 表・写真・図を用いることはできない. これらの全てを 1,000 字以内 (A4 判 2 頁以内) にまとめる.

- (2) 掲載の可否は編集委員会にて決定する. なお, 投稿内容に関連して当事者ないし第三者の意見の併載が必要であると本委員会が認めた場合には, 本委員会より該当者に執筆を依頼し, 併列して編集すること

がある.

7) 英文投稿の場合

A4 判縦にダブルスペースで和文論文について記載した各種論文の分量 (おおむねのページ数) を目安とする. 和文要旨を付し, 図・表その他は和文の場合に準ずる.

5. 別 刷

別刷を希望するときは, 校正時に部数を明記して申し込む.

6. 論文の審査

投稿論文は編集委員会での審査により採否を決定し, その結果を筆頭著者に通知する. 審査にあたっては査読制をとる. 原稿の組体裁, 割付は編集委員会に一任する.

7. 校 正

著者校正は原則として初校において行う. 出版社から送付された校正は, 必ず 3 日以内に返送する. 校正担当者が筆頭著者以外の時は, 校正の責任者と送り先を投稿時に明記する. 校正では間違いを訂正する程度とし, 原稿にない加筆や訂正は行えない.

8. 掲 載 料

出来上がり 4 頁までを無料とし, 超過頁の掲載料は著者負担とする. 白黒写真製版代及びカラー写真, 邦文論文の英文校正料は学会負担とし, 別刷代については半額免除とする. 英文論文の場合は, 英文校正料は学会負担とし, 図版費を含めて掲載料を免除し, 別刷代の半額を免除する.

9. 依頼原稿

依頼原稿は, 総説または原著の形式とし, 査読を必要とせず, 著者校正を行う. 依頼原稿の著者は, 日本臨床細胞学会会員に限らない. 図・表に関しては, 和文での作成を許容する. また掲載料に関しては全額免除とする. 依頼原稿の形式は, 原則として自由であるが, おおよそ総説または原著の形式とし, 編集の観点から編集委員会が形式の変更を執筆者に依頼する場合がある.

10. 二重投稿の取り扱いについて

二重投稿の定義に関しては, 日本臨床細胞学会としては International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)¹⁾ が提唱する基準を参考にし, 査読の時点で違反が認められた場合, 本誌への採用を行わない. また, 既に掲載された論文が二重投稿であることが判明した場合は, その旨の警告を本誌及びホームページに掲載し公開する. 具体的には, 以下の場合を二重投稿と判断する.

1. 既に同一言語で他誌に発表されたか、あるいは他誌に投稿中の論文と内容が同じとみなされた場合
2. 本誌に投稿された論文の図表等の一部が既に他誌に発表されているにもかかわらず、既報の論文を引用していない場合
3. 言語を問わず、既報の論文を故意に引用していない場合
ただし、以下の場合は二重投稿とみなさない。

1. 政府が命じた調査や、国民の健康衛生上早急に公表されねばならない情報で、公的機関や他の学協会から掲載を依頼され、編集委員会（委員長）が認めたもの
2. 学会発表の抄録あるいはポスターとして発表されたもの（本文中にその旨を記入。例：本論文の要旨は第〇回〇〇学会にて発表した。）
3. 極めて限定された読者を対象とした刊行物（例えば院内ニュースレターなど）に掲載された論文
4. ICMJE¹⁾が是認している、いわゆる二次出版(secondary publication)にあたるもの。

なお、投稿者は以下の事項に留意する。

- ・著者は論文投稿に際し、論文の一部が他誌に掲載予定あるいは掲載されている場合は、そのコピーを投稿論文とともに提出し、査読を受けること。
- ・査読委員は査読に際して二重投稿と考えられる論文を発見した場合、速やかに編集委員会（委員長）に報告すること。
- ・本学会員は本誌への投稿のみならず、他誌に投稿される場合も、二重投稿にならないよう留意すること。

参考文献

1. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Overlapping Publications. <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf> (accessed on May 8, 2020)

11. 本規定の改定

投稿規定の改訂は、編集委員会にて決定し、本学会理事

会の承認を得る。

1992年（平成4年）	6月一部改定
1994年（平成6年）	6月一部改定
1997年（平成9年）	6月一部改定
1999年（平成11年）	6月一部改定
2009年（平成21年）	5月一部改定
2009年（平成21年）	6月一部改定
2009年（平成21年）	11月一部改定
2010年（平成22年）	4月一部改定
2010年（平成22年）	9月一部改定
2011年（平成23年）	3月一部改定
2011年（平成23年）	8月一部改定
2012年（平成24年）	4月一部改定
2014年（平成26年）	5月一部改定
2018年（平成30年）	11月17日一部改定
2019年（平成31年）	3月23日一部改定
2019年（令和元年）	9月24日一部改定
2020年（令和2年）	11月21日一部改定（二重投稿に関する規定追加、等）

添付1 Acta Cytologica への投稿について

投稿規定は www.karger.com/acy に明記されていますのでこれに従って下さい。従来は国内での査読を行っていましたが、直接投稿していただくことになりました。

添付2 以下の2項目は毎年1号に掲載する。

- ・ヘルシンキ宣言
- ・人を対象とする医学系研究に関する倫理指針
URL (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-12600000-Seisakutoukatsukan/0000168764.pdf>)

1962年（昭和37年）	本誌発刊
2003年（平成15年）	7月30日日本規定制定
2004年（平成16年）	12月28日全部改正
2008年（平成20年）	7月31日全部改正
2020年（令和2年）	11月21日一部改定

NOTICE TO CONTRIBUTORS

1. Authorial responsibility :

The first author and the corresponding author of this journal must be members of the Japanese Society of Clinical Cytology.

2. Categories of articles :

- 1) The categories of articles which can be submitted in this journal are *review articles*, *original articles*, *investigation reports*, *case reports*, *special articles*, *brief notes*, *letter to the editor*, and *reader's voices* (*requested articles* will be mentioned later).
- 2) The submitted articles should contribute to the advancement of clinical cytology and must be submitted exclusively to this journal.
- 3) Authors must observe the Declaration of Helsinki (recommendations for physicians conducting biomedical studies in humans) and the Ethical Guidelines for Medical and Health Research Involving Human Subjects (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Ministry of Health, Labour and Welfare, March, 2015, <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisaku-jouhou-10600000-Daijinkanboukouseikagakuka/0000080278.pdf>), including privacy protection.
 - * These guidelines appear in the first issue in every year of this journal.
- 4) Copyright for articles published in this journal will be transferred to the Japanese Society of Clinical Cytology, and the authors must agree that the articles will be published electronically by the Society. The authors are permitted to post the title, affiliations, authors' names and the abstract of their article on a personal website or an institutional repository, after publication.
- 5) All authors will be required to complete a conflict of interest disclosure form as a part of the initial manuscript submission process. The form should be downloaded from <http://www.jscc.or.jp/coi/> and should be signed by each author. The corresponding author is responsible for obtaining completed forms from all authors of the manuscript. The form can be downloaded from <http://www.jscc.or.jp/coi/>. The statement has to be listed at the end of the text.

3. Submission style :

- 1) Manuscripts should be submitted electronically.
- 2) For initial submission, please access the site below. (<https://www.editorialmanager.com/jjscc/>)

4. Instructions for manuscripts :

1) Text and writing style

- (1) Manuscript is to be written in Japanese or English.
- (2) Manuscript written in English doesn't need a Japanese abstract.
- (3) Weights and measures are expressed in CGS units (cm, mm, μm , cm^2 , ml, l, g, mg, etc.).
- (4) Names of non-Japanese individuals, drugs, instruments / machines, or diseases that have no proper Japanese terms, academic expressions and scientific terms are to be written in the original language. Capital letters should be used only for proper nouns and the first letter of German nouns. English manuscripts should be prepared essentially in the same manner as Japanese manuscripts.
- (5) Medical terms should be in accordance with the "Saibou-shinn yougo kaisetsu-syu (Handbook of cytological terminology)" edited by the Japanese Society of Clinical Cytology. Abbreviations of medical terms may be used, but the terms should be spelled out in full at their first occurrence in the text and the use of abbreviations is to be mentioned.

2) Manuscript preparation

Manuscripts are to be prepared in accordance with the web site(<https://www.editorialmanager.com/jjscc/>).

3) Electronic files

The following electronic file formats are recommended. Word, RTF, and TXT are recommended for text, and legends : TIFF, JPEG, and PDF are recommended for Figures : Excel are recommended for Tables.

A minimum resolution of 300 dpi size is required for figures for publication.

4) Style of *review articles*, *original articles*, *investigation reports*, *case reports* and *brief notes*.

- (1) Manuscript format

The parts of the manuscript are to be presented in the following order : Title page, abstract, key words, text, conflict of interest disclosure statement, English abstract, references, legends, figures and tables. The pages of the manuscript should be numbered consecutively. Title page should contain the number of revisions (initial submission, first revision, etc.), the category of paper (*original article, case report, brief note*, etc.), Japanese title (not exceeding 50 characters), name (s) of author (s), authors' affiliations, address for reprint requests, and agreement of copyright transfer and early publication must be clearly written on the title page (the first page).

The abstract and key words are to be written on the second page. There should be a separation between the abstract and the start of the text.

(2) Authors

Authors will be limited to persons directly involved in the research. The number of authors is to be as follows, and other persons involved should be mentioned in the *Acknowledgments* section at the end of the paper.

Original articles : no more than 12

Investigation reports : no more than 10

Case reports : no more than 10

Brief notes : no more than 6

Letter to the Editor : no more than 6

Review articles : just one author, as a general rule

(3) Abstract

The text of the abstract should not exceed 500 characters, 300 characters for *brief notes*, and the headings should be comprised of the following. "*Letter to the Editor*" doesn't need an Abstract.

Original articles and *Investigation reports* : Objective, Study Design, Results, Conclusion

Case reports : Background, Case (s), Conclusion

Brief notes : similar to *original articles* or *case reports*

Review articles and *special articles* : headings are to be selected according to content.

(4) Key words

No more than 5 key words indicative of the content of the paper are to be supplied. As a general rule, the first term usually indicates the subject, the second term, the method, the third term and

beyond, the content.

[Titles followed by examples of appropriate key words in parentheses]

Examples of Key words :

—Gallbladder aspiration cytology — Cytological and histological findings in four cases of gallbladder cancer — (Gallbladder, Aspiration, Cancer, Morphology)

—A review of hepatocellular carcinoma (Hepatocellular carcinoma, Morphology, Review)

—A rare case of ovarian clear cell adenocarcinoma cells detected in sputum (Clear cell adenocarcinoma, Cytology, Sputum, Metastasis, Case report)

(5) Text and page limitations

a. *Original articles, review articles, and investigation reports* :

The manuscript should not exceed 10,000 characters (approximately 20 pages of A4 size), including text and references.

Tables should not exceed 10.

Figures should not exceed minimal necessary number.

b. *Case reports* :

The manuscript should not exceed 6,000 characters (approximately 12 pages of A4 size), including text and references. Table should not exceed 5.

Figures should not exceed minimal necessary number.

c. *Brief notes* :

A brief note should not exceed 3,000 characters. No more than 4 figures and no more than one table can be included.

d. *Letter to the Editor*

A short letter-style note, which is concerned to a paper published on this journal, can be submitted as "*Letter to the Editor*" (additional report, question to the author, a comment on a published paper). Titles (study design, results, etc.) in the text are not designated. Two figures, 6 references, and 6 authors can be contained. Abstract is unnecessary. The amount should be approximately within 2 pages at publication style.

(6) English abstract

An English translation of the title, authors' names in Roman letters, authors' affiliations in English, and English abstract should be given on a page separate from the text. The authors' degrees/qualifications are to be written after their names using the following abbreviations.

For physicians : MD ; MD, MIAC ; MD, FIAC.

For dentists : DDS, with other degrees or qualifications abbreviated the same as for physician

For clinical laboratory technologists : MT ; CT, JSC ; CT, IAC ; CT, CMIAC ; CT, CFIAC.

The text of the abstract should not exceed 200 words (exclusive of the title, authors' names and affiliations), and the following headings are to be used.

Original articles and *Investigation reports* : Objective, Study Design, Results, Conclusion

Case reports : Background, Case (s), Conclusion

Review articles : headings should be selected according to their content.

Brief notes : abstracts for *brief notes* should consist of no more than 100 words and no headings are to be used.

(7) References

- a. Only major references are to be listed.

Original articles, special articles, and investigation reports : no more than 30 titles

Case reports : no more than 15 titles

Brief notes : no more than 10 titles

Letter to the Editor : no more than 6 titles

Review articles : no limit

- b. References are to be listed in the order in which they appear in the text, and indicated by superscript numbers in the text.

- c. The references should be listed in the Vancouver style, and the journal abbreviations in Japanese and English references according to the Japan Medical Abstracts Society and Index Medicus, respectively. Examples are shown below.

For journals :

Name (s) of the author (s) (full names for Japanese names ; for European names, surnames of the first 3 authors spelled out, with

initials for the rest of the name, and other authors' names abbreviated "*et al*"). Title (full title should be given). Name of the journal (space) Year of publication ; Volume : Page numbers.(just after publication or for the journal which has only doi, 'no more than doi' is acceptable)

For books :

Name (s) of the author (s). Title. Name of the publisher, Place of publication, Year of publication. If a citation is just one part of an independent book, the title should be followed by the name of the editor, the title of the book, name of the publisher, place of publication, the year of publication, and page numbers.

(8) Figures, tables

- a. Figure and table titles and their legends are to be written in English. Figures and tables are to be numbered thus : Figure 1, Table 1, etc. Provide simple titles and explanations in English.
- b. Clearly state where the figures and tables should be positioned in the text.
- c. Magnifications are to be stated for micrographs. The magnification of the objective lens at the time the figure was taken will be used as the magnification for photomicrographs (figures of cells or tissues). Authors are recommended to use scale bars in the figure. For electron micrographs, the magnification at which the figure was taken should be stated or scales included in the figure.
- d. If figures and tables from another published work are used in the article, permission for publication, including electronic publication, must be obtained from the original author (or organization), and the documents certifying this permission must be attached.

5) **Style of special articles**

Special articles are composed of several papers (*original articles* or *reviews*) on a single topic. The planners of *special articles* need to prepare the title of the whole special issue (in Japanese and English) and a synopsis (equivalent to an introduction) of no more than 1,200 characters. The style of *special articles* should be the

same as for *original articles* and *review articles*.

6) *Reader's voices*

Submissions which do not fit the above-described categories for scientific papers, including opinions on papers already published in the journal, the operation and activities of the Japanese Society of Clinical Cytology, are also published, but only if they have not been presented elsewhere. Submissions should be in accordance with the following prescribed form and procedure.

- (1) The title is not to exceed 50 characters, and a corresponding English title should be provided.

The text should be started on a new line.

At the end of the text, the name (s) of author (s) (with the authors' qualifications), institutional affiliations and addresses should be written in Japanese and English on separate lines. As a general rule, there should be just one author. References can be added at the end, but no tables, pictures and figures. All of the above should be no more than 1,000 characters (no more than 2 pages of A4 size).

- (2) The editorial board will decide whether a submission will be published. If the Committee finds it necessary to also publish the opinion of a person referred to in the manuscript or a third party in regard to the content of the paper submitted, the Committee will request that the person concerned write it, and the two will be published together.

7) *English manuscripts*

English manuscripts are to be written double-spaced on A4 paper, and should not exceed the amount of the approximate numbers of A4 paper pages, which were mentioned for Japanese-written manuscript of each type. Figures, tables, etc. are to be prepared in the same manner as the Japanese manuscript.

5. *Reprints* :

When reprints are desired, the author should state the number of copies to be ordered when returning the first galley proof.

6. *Review of the manuscript* :

Whether a manuscript submitted for publication will be accepted is determined by a review conducted by the

editorial board, and the first author will be notified of the results. The referee system is used to conduct these reviews. The editorial board will be responsible for the layout and format used in printing the manuscript.

7. *Proofreading* :

The publisher will send the first galley proof to the first author, who should check and return it within three days. When the person responsible for proofreading is someone other than the first author, the person's name and address must be clearly stated when the manuscript is submitted. Only errors can be corrected on proofs. Nothing that is not already in the manuscript can be added or corrected.

8. *Publishing fee* :

Authors will be charged for space in excess of 4 printed pages. There will be no charge for the cost of printing black-and-white and color figures, and for English proofreading. Half the charges for reprints of Japanese articles will be waived, and the publishing fees, including plate making charges, for English articles will be waived.

9. *Requested articles* :

Although the form of the requested article is at the author's own choice, it may be generally accepted near the style of *review articles* or *original articles*. In a case, editorial board may request the author for changing the style.

10. *Duplicate submission* :

If a given submission came to be a "duplicate submission", whose criteria we would like to concern proposed by "International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)¹⁾", it would be rejected at the time of its review. Or, in the case that a subscription revealed to be a "duplicate submission" after publication, this situation would be known publicly with caution on this journal and on our Society's web site. The editing committee would recognize a submission as follows :

- 1) The submission which was thought to be similar to another one which has already been published in the same language, or which has the same contents as the other submitted elsewhere.

- 2) The figure or table, which has already published on another journal, without referring to the previous journal.
- 3) The submission doesn't refer to the previous manuscript regardless of the language it uses.

On the other hand, the following will not be recognized as a duplicate submission :

- 1) The researches or information 1) that was ordered by the government and should be made open immediately for public health and welfares, 2) that was recommended to be reprinted by public organization and another academic society, and 3) the editing committee (the chairperson) recognizes it.
- 2) The content which has already published in an academic meeting as a proceeding or a poster (the author should mention in the text of the manuscript, the name and number of academic meeting where that was opened.)
- 3) The manuscript printed or opened in the media which is distributed in a very restricted area (hospital newsletter, for example)
- 4) So called secondary publication which ICMJE¹⁾ acknowledges.

The author should pay attention to some points as follows :

- ✓ The author should submit concomitantly the copy of one's manuscript, which has already published or to be published in the future, at the submission to JJSCC to be reviewed.
- ✓ The reviewer should notify the duplicate submission to the editorial committee (chairperson) immediately after awareness of it.
- ✓ All the members of this association should avoid duplicate submission not only to JJSCC but also to other journals.

Reference :

1. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals : Overlapping Publications. <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf> (accessed on May 8, 2020)

11. Revision of these rules :

The rules for submitting manuscripts may change. The change of the rules for submission is to be acknowledged by editorial committee. The change of economic issue such as submission fee or of ethical policy, which is considered to be important, should be accepted by the governing board of the society.

- (Partial revision June 1992)
- (Partial revision June 1994)
- (Partial revision June 1997)
- (Partial revision June 1999)
- (Partial revision June 2009)
- (Partial revision November 2009)
- (Partial revision April 2010)
- (Partial revision September 2010)
- (Partial revision March 2011)
- (Partial revision April 2012)
- (Partial revision May 2014)
- (Partial revision November 2014)
- (Partial revision December 2014)
- (Partial revision March 2015)
- (Partial revision January 2017)
- (Partial revision November 17th, 2018)
- (Partial revision May 23rd, 2019)
- (Partial revision September 24th, 2019)
- (Partial revision November 21st2020)

Appendix 1. Submission of manuscripts to Acta Cytologica

Please go the new Acta Cytologica website (www.karger.com/acy) and read guidelines for manuscript submission. Submission of manuscripts to the Japanese Editorial Office for preparatory review has been abolished.

Appendix 2. The following 2 items will appear in the first issue of every year.

—Declaration of Helsinki

—Ethical Guidelines for Medical and Health Research Involving Human Subjects

(<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10600000-Daijinkanboukouseikagakuka/0000080278.pdf>)

History of the Journal :

This Journal was established in 1962.

This rules for submission was enacted in July 30, 2003.
Major revision was made in December 28, 2004, and July 31, 2008.
Major revision in June 2020 was made concerning double

submission, categories of submission, and their volume limitations.

November 21, 2020

日本臨床細胞学会編集委員会 (令和元年～3年)

委員長: 矢納 研二					
担当理事: 大平 達夫	竹島 信宏	三上 芳喜			
(副委員長): 黒川 哲司	柳井 広之				
委員: 伊藤以知郎	河原 明彦	九島 巳樹	近藤 英司	品川 明子	田中 良太
長尾 俊孝	二村 梓	野村 秀高	則松 良明	廣川 満良	古田 則行
前田 宜延	的田 眞紀	棟方 哲			
幹事: 安倍 秀幸	谷口 智子	西川 武			
査読委員: 青木 裕志	明石 京子	明瀬 光里	秋葉 純	浅見 志帆	阿部 仁
阿部 彰子	阿部 英二	安倍 秀幸	新井 正秀	荒木 邦夫	有田 茂実
有廣 光司	有安 早苗	五十嵐 誠治	伊倉 義弘	池上 雅博	池田 聡
池田 純一郎	池田 徳彦	池畑 浩一	池本 理恵	伊古田 勇人	石井 真美
石岡 伸一	石川 雄一	石田 和之	出馬 晋二	磯西 成治	井谷 嘉男
市村 友季	伊東 恭子	伊藤 崇彦	伊藤 雅文	稲垣 宏	稲山 嘉明
井野 元智恵	今井 裕	今井 律子	今野 元博	今村 好章	井村 穰二
入江 準二	岩崎 雅宏	岩瀬 春子	岩田 卓	岩屋 啓一	上田 和
宇佐 美知香	碓井 宏和	白田 実男	内田 克典	内山 智子	宇津木 久仁子
梅澤 敬	浦野 誠	卜部 理恵	卜部 省悟	江口 正信	蝦名 康彦
遠藤 浩之	小穴 良保	及川 洋恵	大石 徹郎	大井 恭代	大金 直樹
大亀 真一	大久 保文彦	大崎 博之	大崎 能伸	大城 久	太田 善夫
大谷 博	大塚 重則	大沼 利通	大野 喜作	大橋 隆治	大原 樹
大森 真紀子	岡 輝明	小賀 厚徳	岡田 真也	緒方 衝	岡 俊郎
岡部 義信	岡本 聡	岡本 三四郎	岡本 吉明	小倉 豪	小椋 聖子
刑部 光正	尾崎 敬	尾崎 聡	小田 義直	小野里 香織	小野 瀬亮
尾松 公平	小山 徹也	甲斐 敬太	利部 正裕	垣花 昌俊	覚野 綾子
笠井 孝彦	笠松 高弘	梶原 直央	梶原 博	加勢 宏明	片岡 竜貴
片岡 史夫	片山 博徳	香月 奈穂美	加戸 伸明	加藤 拓	加藤 一喜
加藤 智美	加藤 友康	門田 球一	金尾 祐之	金山 清二	金山 和樹
金子 千之	鹿股 直樹	神尾 多喜浩	鴨井 青龍	川崎 隆	川崎 朋範
川瀬 里衣子	川名 敬	河野 光一郎	河野 哲也	河原 邦光	河村 憲一
川村 直樹	神田 浩明	菊池 朗	木佐 貫篤	岸野 万伸	鬼島 宏
岸本 浩次	北澤 理子	北澤 莊平	木下 勇一	木村 文一	喜友 名正也
清川 貴子	草苧 宏有	草野 弘宣	久慈 志保	串田 吉生	工藤 明子
久布 白兼行	熊木 伸枝	久山 佳代	黒瀬 圭輔	黒田 敬史	黒田 直人
黒田 一	孝橋 賢一	小材 和浩	小島 淳美	小塚 祐司	小林 佑介
小林 裕明	小林 博久	小林 陽一	小宮 山慎一	小山 芳徳	近藤 哲夫
近内 勝幸	齋藤 生朗	嵯峨 泰	坂谷 貴司	坂本 優	佐川 元保
桜井 孝規	佐々木 陽介	佐々木 素子	笹野 公伸	佐治 晴哉	佐藤 誠也
佐藤 正和	佐藤 美紀子	佐藤 慎也	佐藤 康晴	佐藤 由紀子	郷久 晴朗
澤田 達男	塩澤 哲	澁木 康雄	澁田 秀美	澁谷 潔	澁谷 信介
島田 宗昭	島田 啓司	清水 和彦	清水 健	清水 道生	清水 禎彦
下釜 達朗	白石 泰三	菅井 有	須貝 美佳	杉田 好彦	杉山 裕子

酒々井夏子	鈴木雅子	鈴木 淳	鈴木 直	鈴木正人	鈴木美和
関田信之	芹澤昭彦	園田 顯三	駄阿 勉	多比良朋希	高倉 聡
高瀬頼妃呼	高田恭臣	高野忠夫	高野浩邦	高野政志	高橋 顕雅
高橋芳久	高橋恵美子	鷹橋浩幸	高松 潔	田口雅子	田口健一
竹井裕二	武田麻衣子	竹原和宏	田尻 琢磨	橘 啓盛	楯 真一
田中京子	田中綾一	田中一朗	田中尚武	田中浩彦	棚田 諭
谷川輝美	谷口智子	谷山清己	田沼順一	田原紳一郎	玉手雅人
田丸淳一	千酌 潤	塚田ひとみ	辻村 亨	津田 均	土田 秀
筒井英光	角田 肇	寺井義人	寺田倫子	寺畑信太郎	寺本典弘
寺本瑞絵	土居正知	田路英作	徳田雄治	渡具知 克	徳永英樹
戸澤晃子	栃木直文	富永英一郎	豊田進司	鳥居貴代	内藤子来
内藤嘉紀	永井雄一郎	中泉明彦	中尾佳史	長阪一憲	長坂徹郎
中里宜正	中澤久美子	長嶋 健	永瀬 智	中塚伸一	仲村 勝
中山富雄	中山宏文	中山 淳	南部雅美	新倉 仁	西川 鑑
西川 武	錦見恭子	西田直代	西野幸治	西村理恵子	西森 誠
西山憲一	布引 治	野澤真由	能登原憲司	野中道子	野村弘行
野本靖史	橋口真理子	長谷川清志	秦 美暢	畑中一仁	服部 学
馬場洋一郎	羽原利幸	濱川真治	林 茂徳	林 真也	林 俊哲
原由紀子	原田憲一	坂東健次	阪埜浩司	東田太郎	東 美智代
樋口佳代子	飛田 陽	秀島克巳	平沢 晃	平田哲士	平林健一
廣井禎之	廣島健三	廣田誠一	福島万奈	福島裕子	福屋美奈子
藤井丈士	藤田茂樹	伏見博彰	藤山淳三	藤原寛行	二神真行
古田玲子	古旗 淳	星 利良	星田義彦	細根 勝	堀江香代
堀由美子	彭 為霞	前田純一	前田ゆかり	増田健太	増田しのぶ
町田知久	松井成明	松浦基樹	松澤こず恵	松下 宏	松田育雄
松田勝也	松永 徹	松林 純	松本光司	松本慎二	松元 隆
松山篤二	丸 喜明	丸川活司	丸田淳子	三浦弘守	三浦弘之
水野美香	三橋 暁	湊 宏	南 優子	南口早智子	三村明弘
宮井由美	宮城 淳	三宅真司	三宅康之	宮崎龍彦	宮嶋葉子
宮本朋幸	村田晋一	村田哲也	望月紀英	元井 亨	物部泰昌
森定 徹	森下由紀雄	森 康浩	森村 豊	八重樫伸生	安岡弘直
安田政実	矢田直美	柳田 聡	矢野恵子	矢野博久	山上 亘
山口知彦	山口 浩	山口 倫	山崎奈緒子	山下 博	山田隆司
山田 隆	山田麻里沙	山田恭輔	山田鉄也	山田範幸	山元英崇
山本晃人	矢持淑子	横井豊治	横尾英明	横瀬智之	横山俊朗
吉岡治彦	吉田 勤	吉田浩一	吉野 潔	吉見直己	米田 操
米山剛一	梁 善光	和田直樹	渡部 洋	渡 邊 純	渡辺寿美子
渡邊みか					

(50音順)

令和三年五月二十二日発行

編集兼
発行人

公益社団法人
日本臨床細胞学会
代表者 矢納 研二

〒100-10061 東京都千代田区神田駿河台二丁目一
番一
駿河台サンライズビル三階
公益社団法人 日本臨床細胞学会
発行所
電話〇三(五七七)四六八〇 振替〇〇一〇一〇一三三五四五