

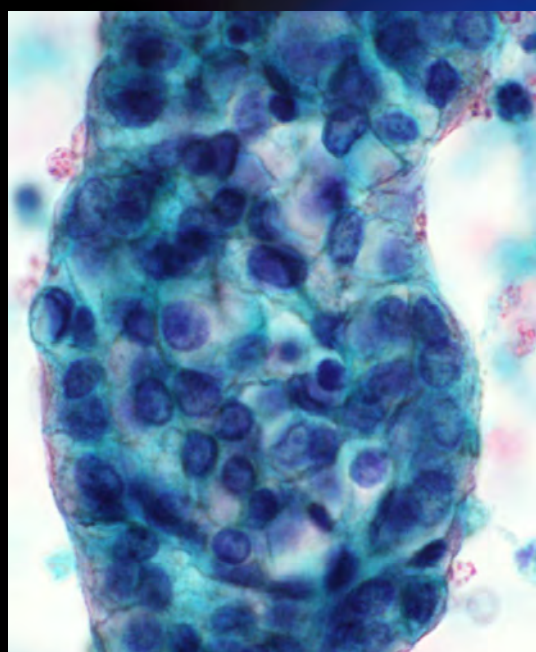
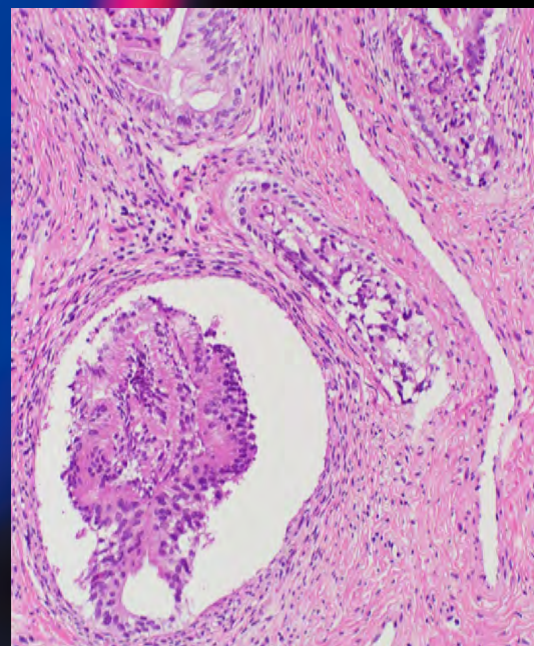
ONLINE ISSN 1882-7233
PRINT ISSN 0387-1193

日 臨 細 胞 誌
J.Jpn.Soc.Clin.Cytol.

第60巻 第2号 令和3年3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. 2
Mar. 2021

目 次

巻頭言	植田 政嗣
-----	-------

〈依頼原稿〉

液状化細胞診検体を用いたコンパニオン診断の試み

——精密医療 Precision Medicine における細胞診断の役割——

杏林大学医学部呼吸器・甲状腺外科学教室 田中 良太	(75)
---------------------------	--------

〈原 著〉

癌性腹膜炎，腹水貯留症例における腹水セルブロック法による治療方針決定について

中通総合病院産婦人科 小西 祥朝・他	(86)
--------------------	--------

子宮頸がん集団検診における AGC (atypical glandular cells) 症例の追跡結果

公益財団法人福島県保健衛生協会 森村 豊・他	(94)
------------------------	--------

液状化検体細胞診を用いたセルブロック法の核酸品質の解析と保管への影響

久留米大学病院病理診断科・病理部 安倍 秀幸・他	(102)
--------------------------	-------

〈症 例〉

多彩な像を示した乳腺化生癌の穿刺吸引細胞診の 1 例

JA 広島厚生連吉田総合病院病理研究検査科 青木 章乃・他	(110)
-------------------------------	-------

子宮内膜細胞診が契機となり腹腔鏡下手術で診断しえた右卵巢微小漿液性境界悪性腫瘍の 1 例

鳥取県立厚生病院中央検査室 長尾 瑞歩・他	(117)
-----------------------	-------

尿細胞診に胃型腺癌が出現した OHVIRA 症候群の 1 例

山梨大学医学部附属病院病理部 中澤久美子・他	(122)
------------------------	-------

投稿規定	(129)
------	-------

編集委員会	(139)
-------	-------

＊

〈表紙写真〉

尿細胞診に胃型腺癌が出現した OHVIRA 症候群の 1 例

(左：パパニコロウ染色，右：H-E 染色) (中澤久美子・他，左：Photo. 4b, 125 頁，右：Photo. 6a, 126 頁)

CONTENTS

Editorial.....	Masatsugu Ueda
----------------	----------------

Requested Article

Value of Liquid-based cytology for Companion Diagnostics and Roles of Cytologic Diagnostics on Precision Medicine Ryota Tanaka (Dept. of Surg., Kyorin Univ. School of Med., Tokyo)	(75)
--	--------

Original Articles

The cell block method is useful for predicting the primary site of cancer in cases of peritonitis carcinomatosa Yoshitomo Konishi et al. (Dept. of Obst. and Gynecol., Nakadori General Hosp., Akita)	(86)
Follow-up results in patients with atypical glandular cells detected on uterine cervical cancer screening Yutaka Morimura et al. (Fukushima Preservation Service Association of Health., Fukushima)	(94)
Nucleic acid quality in sodium alginate cell blocks prepared from liquid-based cytology specimens Hideyuki Abe et al. (Dept. of Diag. Path., Kurume Univ. Hosp., Fukuoka)	(102)

Clinical Articles

Fine-needle aspiration cytology evaluation of metaplastic breast carcinoma showing histological diversity ——A case report—— Ayano Aoki et al. (Dept. of Path., JA Yoshida General Hosp., Hiroshima)	(110)
A case of ovarian serous borderline tumor diagnosed by endometrial cytology and treated by laparoscopic salpingo-oophorectomy Mizuho Nagao et al. (Dept. of Central Med. Lab., Tottori Pref. Kousei Hosp., Tottori)	(117)
Urinary cytologic findings of gastric-type adenocarcinoma in a case of OHVIRA syndrome Kumiko Nakazawa et al. (Dept. of Path., Univ. of Yamanashi Hosp., Yamanashi)	(122)
Notice to contributors.....	(129)

Cover Photo

Urinary Cytologic findings of Gastric-type Adenocarcinoma in a Case of OHVIRA (Left : Pap. stain, Right : H-E stain) (Kumiko Nakazawa, et al., Left : Photo. 4b, p125, Right : Photo. 6a, p126)	
--	--



巻頭言

Masatsugu Ueda

植田 政嗣

細胞診専門医会会長 細胞診専門医委員会委員長

畿央大学大学院 健康科学研究科

▶ 新しい細胞診専門医制度



日本臨床細胞学会は、1961年に発足した婦人科細胞診談話会にその他の領域のものが加わって発展的に組織されたものです。学会の拡充にともない、細胞診の実務に強い専門医的な資格を作って学会活動の一層の充実を図りたいとの目的から、1968年に細胞診指導医が誕生することになりました。これは、英語の active member あるいは fellow を意図したものであって、検鏡の実力があることと学問的研究の先頭に立つことがその条件であるとされました。現在の細胞診専門医や英語の cytopathologist に相当する細胞診断医という名称を採用しなかったのは、後輩の医師や検査技師を検鏡や研究の面で指導し、学会をリードしてゆくという意気込みが強かったからではないかと想像されます。このようにして当初68名が細胞診指導医として認定され、同年広島において第1回の専門医会（その当時は指導医会と呼称）が開催されました。初代の代表世話人に天神美夫先生が就任され、以後、野田起一郎、栗原操寿、信田重光、杉森 甫、野澤志朗、長谷川壽彦、平井康夫、柏村正道、覚道健一、土屋眞一各先生が会長を務められ、私が第12代目の会長となります。この歴史ある細胞診専門医会は「細胞診断実務に関する医師、歯科医師並びに技師の教育・指導に当たること」を目的とし、会長の下に総務、庶務、生涯教育担当、会計、あり方委員会、会報編集委員会が設けられており、学会理事会での実務においては細胞診専門医委員会と密接に連携しています。細胞診専門医の位置づけは「がんの予防および治療に必要とされる細胞診についての専門的な知識、技術、態度を身につけ、自らが行う臨床実務のみならず、精度管理や細胞検査士等の指導・育成など幅広い活動を通じて国民の福祉に貢献する医師」と規定されています。細胞診専門医会ならびに細胞診専門医委員会の目指す取り組みは、専門医の研修、資格認定・更新を通じて社会貢献の出来る優れた専門医を輩出することです。現在、細胞診専門医は、実数3060名（認定：細胞診専門医3730名、細胞診専門歯科医102名）で、細胞検査士との協力の下に学会を支える大きな力となっています。

専門医認定・更新に関しては、2014年に日本専門医制評価・認定機構を母体として発足した日本専門医機構（2016年に改組）により、これまでに、基本領域専門医19領域が認定されており、2021年度からは、内科系および外科系のサブスペシャリティ領域専門医の認定が開始される予定です。日本専門医機構の指針では、専門医資格更新においても厳密な運用が求められています。専門医資格の更新に際しては、診療に従事していることを示す勤務実態や診療実績の証明、知識や技能・態度が適格であることを証明することが必須であり、ペーパードライバーは決して認めない方向性が打ち出されています。基本的に5年毎の資格更新が想定されており、①診療実績の証明（最大10単位）、②専門医共通講習（最低5単位、最大10単位、このうち3単位は必修講習）、③診療領域別講習（最低20単



位、最大 45 単位)、④学術業績・診療以外の活動実績(最大 10 単位)の 4 項目について 5 年間で合計 50 単位の取得が必要です。本学会では標記項目に則して、「細胞診専門医資格更新実務に関する施行細則」の改定を行い、本細則は 2015 年度以降の細胞診専門医資格認定試験合格者ならびに資格更新者から適用されます。2020 年度には新しい施行細則の下での初めての資格更新作業が行われました。

新しい研修、資格更新システムでは、専門医が最新の知識や技能を身につけるために必要な講習等を常日頃から受講すること(いわゆる生涯学習)が非常に重視される審査基準となっています。これは、おおむね 1 時間あたりの講習受講で 1 単位とされており、多忙な臨床医や大都市圏で開催されることの多い学会やセミナーへの参加が難しい地方在住の勤務医等にとっては非常に厳しい内容となっています。生涯学習には勤務先や自宅でネットを介して受講できる e ラーニングも認められており、すでに日本産科婦人科学会等の基本領域学会では e ラーニングシステムが稼働しています。そこで、本学会においても 2016 年度から細胞診専門医セミナーや医療安全、感染対策、医療倫理などの共通講習プログラムを DVD に録画し、これらの講演内容を e ラーニングとして web 配信するべく準備を進めてきました。2019 年 2 月より、本会会員専用ページ(マイページ)からリンクする e ラーニング学習画面において、細胞診専門医共通および診療領域別講習の e ラーニング動画を無料で閲覧できるシステムが稼働し、3 月より e ラーニングでの単位取得が可能となっております。動画閲覧後の確認テストに回答後、1 つの動画につき、4,000 円(税別)のクレジット決済を行うと、動画 1 コンテンツにつき 1 単位が付与され、e ラーニング受講履歴が学習画面に表示されます。

コロナ禍に収束の兆しが見えず、新型コロナウイルスとの共存が必要となった現在、学会活動も web 形式が主体となり、従来とは全く異なる対応を余儀なくされております。このような情勢の中、いつでもどこでも何度でも聴取できる e ラーニングシステムはまさに時代に適合した生涯研修のためのツールと言えます。更新に必要な 50 単位中、共通および診療領域別講習単位が重視されており、特に診療領域別講習単位は最低 20 単位必要、最大 45 単位まで取得可能となっております。本学会が提供する e ラーニングシステムを、知識の習得はもとより、今後の単位取得に向けて積極的に活用して頂けることを期待しております。

細胞診専門医制度も現在大きな曲がり角にさしかかっています。日本専門医機構の提示する専門医制度整備基準も各学術団体からの要請に応じて少なからず修正されることが予想され、先行き不透明な面があります。細胞診専門医がサブスペシャリティ領域専門医として認定されるかどうかは、基本領域である病理学会や日本産科婦人科学会のサブスペシャリティ領域連絡協議会において検討中ですが、制度設計上、機構認定医へのハードルが高いことや、デメリットも多いことから現状では見合わせる方向で議論されております。しかし、学会認定医として存続する場合でも、資格更新制度には上述したような厳密な運用が求められます。専門医の先生方におかれましては、細胞診専門医会や細胞診専門医委員会からのアナウンスやホームページに掲載される最新情報に十分ご留意頂くとともに、今後各学会における医療安全、感染対策、医療倫理講習会や各種教育セミナー等、専門医共通講習や診療領域別講習に該当する出席証明書、学会参加実績などを必ず記録保管し、新研修制度に備えて頂きたいと思います。また、ご自身の単位取得状況を十分に検証して頂いた上で、不足単位は e ラーニングシステムにより早めに補うようご配慮頂きたいと思います。細胞診専門医会ならびに細胞診専門医委員会では、今後とも施設認定制度委員会や教育委員会等と密接に連携を取りながら、これからの新たな専門医制度の構築をサポートしていくつもりです。専門医の先生方のご協力をお願いするとともに、ご意見を専門医会ホームページあるいは各種委員会を通じて是非お寄せ頂きたいと思います。

依頼原稿

液状化細胞診検体を用いたコンパニオン診断の試み

——精密医療 Precision Medicine における細胞診断の役割——

田中 良太

杏林大学医学部呼吸器・甲状腺外科学教室

わが国ではがん対策推進基本計画に基づいて、遺伝子パネル検査の導入や精度管理体制の構築が課題となっている。その中で患者の治療に直接影響する医薬品の効果や副作用を、投薬前に予測するためのコンパニオン診断は大変重要である。一方、液状化細胞診（LBC）検体はコンパニオン診断を前提として、取り扱われた経緯がないのが現状である。そこでわれわれはLBC検体を用いたコンパニオン診断の実行可能性について2つの検証実験を行った。1つ目は肺癌切除標本から腺癌40検体を対象として擦過材料を用いて検討した。サイトリッチTMレッド保存液で固定した後にEGFR/KRAS遺伝子変異、その後ALK/ROS1融合遺伝子の解析を施行した。2つ目は実際の気管支鏡で用いた器具の洗浄液をサイトリッチTMレッド保存液で固定し、コバスEGFR変異検出キットv2.0TMで解析した。LBC検体での検出率は40%（8/20）で、同時に採取したFFPE組織材料の35%（7/20）、血漿材料の20%（4/20）と比較して、LBC固定後のセルブロックでは良好な結果であった。今後LBC検体による効率的な細胞回収と検体処理を提示することは、コンパニオン診断の精度をさらに改善する一助になると考える。そして今後の精密医療の発展と効率化への関与が期待される。

Key words : Liquid-based cytology, Companion diagnostics, Cell block, Precision medicine, Next generation sequencer

I. はじめに

今回、本学会誌の矢納研二編集長より第61回日本臨床細胞学会総会春期大会における教育講演I（タイトル：液状化細胞診検体を用いたコンパニオン診断の現状）の内容¹⁾を本誌上で公表されてはとご提案があり、今回依頼原稿という形で執筆の機会をいただくことになった。このようにさらに広く学会員の皆様に情報共有できる機会をいただ

き、編集長をはじめ編集委員の先生方、そして学会員の皆様に心より感謝を申し上げる。

さて背景としてわが国ではがん対策推進基本計画に基づいて、遺伝子パネル検査の導入と精度管理に向けた体制の構築が、病理・臨床検査において直近の課題となっている。その中で患者の治療に直接的に影響する医薬品の効果や副作用を、投薬前に予測するためのコンパニオン診断薬の使用の適正化は大変重要な位置づけとなった。一方、婦人科を中心として導入されてきた液状化細胞診検体（liquid-based cytology : LBC）は、今日までコンパニオン診断を前提として取り扱われた経緯はなく、またその検体処理や標本作製のための手順については、各施設の判断で決められた方法が採用されている。今後LBCの取り扱いについては学会内でも引き続き活発な議論がされると思われる。本論文ではタイトルを「液状化細胞診検体を用いたコンパニオン診断の試み—精密医療 Precision Medicine における細胞診断の役割—」として、前半に「液状化細胞診検体」

Value of Liquid-based cytology for Companion Diagnostics and Roles of Cytologic Diagnostics on Precision Medicine

Ryota TANAKA, M. D., M. I. A. C.

Department of Surgery, Kyorin University School of Medicine

論文別刷請求先 〒181-8611 東京都三鷹市新川6の20の2 杏林大学医学部呼吸器・甲状腺外科学教室 田中良太

令和2年8月24日受付

令和2年8月24日受理

Table 1 代表的な2つのLBC作製法の特徴と相違（文献4より引用，一部改変）

	SurePath™	ThinPrep™
細胞の回収率	100%	60%
一回の処理能力	48枚/120分	20枚/40分
標本作製工程	煩雑・手間	簡単・ほぼ自動化
用手法	可能	不可能
塗抹原理	密度勾配/沈殿法	フィルター濾過/転写法
分離剤	使用	使用しない
塗抹範囲	直径13mm（従来法の約1/10）	直径19mm（従来法の約1/5）
塗抹状態	均一/均等（大集塊，多）	均一/空白あり（大集塊，少）
固定保存液組成	レッド：イソプロパノール エチレングリコール ホルマリン（0.4%） ブルー：エタノール ポリエチレングリコール	メタノール 約50%
細胞形態保持 （保証期間）	レッド：室温（15～30℃） 30日以上安定，最高6ヵ月 ブルー：室温（15～30℃） 14日間安定	室温（25℃以下） 6週間
細胞像	立体的 細胞収縮・核濃染傾向	平面的 細胞膨化・核淡染傾向
不適正標本	少ない	少ない～多い

と「コンパニオン診断」の2つのテーマを簡潔に述べさせていただき，そして臨床現場で今後どのようにLBCが適応していくかについて，「臨床診断への適合と活用」として私が専門とする肺癌領域の内容に絞って解説する．また当教室で行った2つの検証実験の結果を紹介し，今日までに蓄積された情報のエッセンスをまとめて報告する．

II. 液状化細胞診検体（LBC）

最初に液状化細胞診検体（以降LBCと略す）について，今回は非婦人科領域（特に呼吸器検体）を中心に解説する．LBCを導入することのメリットは主に次の3つのポイントが挙げられる^{2,3)}．

- ① サンプリング技術の個人差が生じないことによる不適正検体の減少，その効果としては，標本作製の均一化と標準化につながると考える．
- ② スクリーニング時間の短縮による作業の効率化によって，鏡検時間の短縮につながることが期待される．
- ③ 保存検体からそのまま核酸抽出ののち遺伝子検査が可能である．
その一方，導入に向けた問題点や今後の課題としては，
① 標本作製のために時間を要する．例えばそれは用手法か，あるいは専用機器を用いた自動塗抹法か，などの違いによる影響も考慮する必要がある．
② 標本のアーチファクトが少なくなることで，診断の精

度向上につながることを期待される．しかしながら，通常塗抹法と比べて細胞形態が異なり検鏡には慣れが必要で，さらに固定や標本作製の方法の違いも判定に考慮が必要である．慣れるまでは通常塗抹法と併用することが望ましい．

- ③ 標本作製にかかわるコストの問題を検討する必要がある．

非婦人科領域では保険収載が限定的な状況にあり，今後その適応が拡大されることが期待される．主に代表的なLBCによる標本作製法にはSurePath™（BD Diagnostics社）とThinPrep™（Hologic社）の2つが挙げられ，現在当院においてはこれらの2つが採用されている．両者の標本作製法の特徴や相違点をTable 1にまとめた⁴⁾．まず明らかに異なる点は標本作製原理の違いで，SurePath™では専用のスライドガラス上にマイナス荷電した細胞が吸着する沈降法であるのに対し，ThinPrep™は専用フィルターを用いた自動塗抹処理による転写法である．その違いにより細胞の塗抹状態が異なってきて，細胞所見の取り方にも細心の注意が必要である．またさらに大きく異なる点は専用固定液の組成の違いで，ThinPrep™ではメタノールが主成分となるが，SurePath™は非婦人科用としてレッドとブルーの2種があり，さらに両者で成分が異なる．レッドではわずかにホルマリン（0.4%）が入っており，比較的に長く安定的に細胞形態の保持が可能で，室温のまま最高6ヵ月間の形態保持と保存が可能である．そしてこのサイトリッ

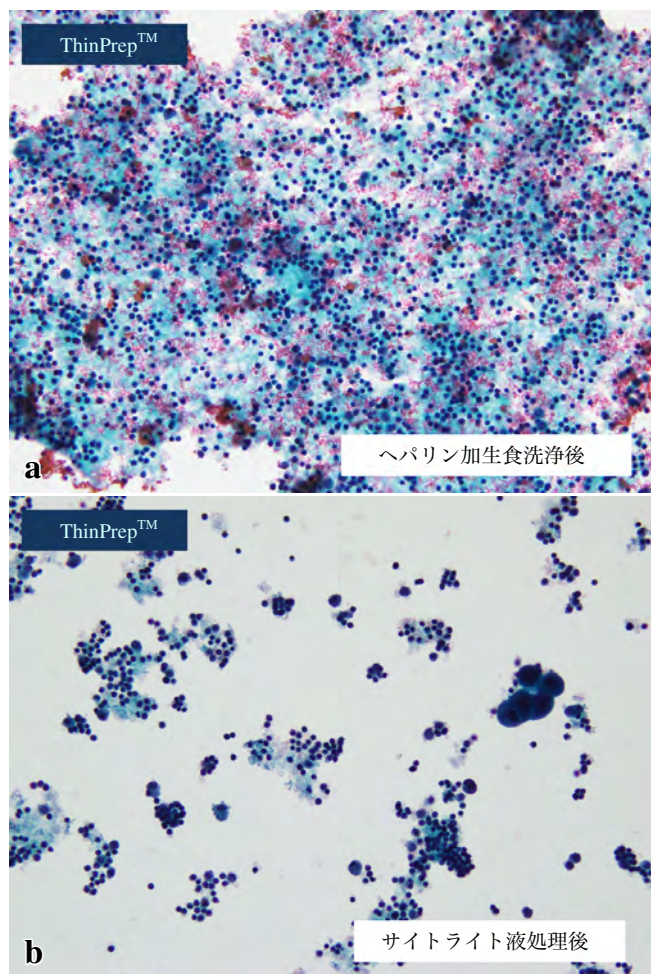


Photo. 1 原発性肺癌による癌性胸膜炎の胸水細胞診の一例 (LBC 法)

a: 前処理としてヘパリン加生理食塩水で洗浄した後に ThinPrep™法で標本作製した (Papanicolaou 染色, $\times 20$).

b: 前処理として PreservCyt® 液 (Hologic 社) で洗浄した後に ThinPrep™法で標本作製した (Papanicolaou 染色, $\times 20$). 背景の血液や蛋白の凝集塊が取り除かれ腫瘍細胞が良好に観察できる (a と同一症例).

チ™レッドでは、血液や蛋白の溶解物質が含まれており、血液を多く含む検体に対しても適応が可能である。ThinPrep™においても PreservCyt® 液 (Hologic 社) という専用の保存液を用いて前処理を加えれば、血液や蛋白の溶解作用によって、凝集を抑え背景をきれいにすることが可能である。ThinPrep™による標本作製の際に血液やリンパ液を多く含む胸水検体などに対し、PreservCyt® 液 (通称、サイトライト液) の使用に関しては検討の余地があると考え (Photo. 1)。主に腫瘍断面の擦過から得られた検体を例として、SurePath™と ThinPrep™のそれぞれの細胞所見の違いや特徴⁵⁾について症例を取り上げて解説する (Photo.

2, Photo. 3)。全体として SurePath™のほうが ThinPrep™に比べ、細胞密度が高く均等に塗抹される傾向がある。一方、ThinPrep™ではスライドガラスに細胞を圧着転写させるため、細胞集塊および細胞が平面的にみえ、核・細胞質が膨化してみられる傾向がある。また個々の細胞所見がより鮮明となり、核小体も明瞭化してみられる。沈降法である SurePath™では液体中に浮遊する細胞が、そのままスライドガラスに荷電吸着するため、直接塗抹法よりもさらに立体的に塗抹される。SurePath™では固定液としてサイトリッチ™レッドを使用しているため、通常の直接塗抹法で見られるような凝集等のアーチファクトは、蛋白可溶化作用によって取り除かれ観察しやすくなる。以上のように LBC の利点を最大限に活かし問題点を克服することで、非婦人科領域においても今後ますます利用機会が増えると推測する。

III. コンパニオン診断

コンパニオン診断 (companion diagnostics: CDx) とは 2013 年の厚生労働省が公表した技術的なガイダンスによると、「個別化医療の中でも、疾患等に関連するバイオマーカーを利用して医薬品の投与対象患者を特定する場合、当該医薬品使用の前提として体外診断用医薬品 (以下、体外診断薬という) を使用することとなるが、このような治療薬の選択等に用いられることにより個別化医療に資する体外診断薬をコンパニオン診断薬と呼ぶ。」と定義されている。簡潔に言い換えるとコンパニオン診断薬とは、「特定の医薬品の有効性または安全性の向上等の目的で使用し、当該医薬品の使用に不可欠な体外診断薬」と定義される。そして薬事法に基づいたコンパニオン診断薬を含む体外診断薬を *in vitro* diagnostics (IVD) と呼び、従来の各医療機関の検査室で独自に開発された laboratory developed test (LDT) とは異なる概念として位置づけられた。本邦で承認された肺癌診療において代表的なコンパニオン診断薬の一覧を Table 2 に示した。診断薬の開発当初は単一の遺伝子異常に対して、特定の治療薬を用いるという一対一の関係であった。その後、現在までに診断薬の検証実験や医薬品の臨床試験を積み重ねることで、中には 1 つの診断薬に対し複数の候補薬剤が挙げられることもある。一方、米国のオバマ前大統領の 2015 年一般教書演説では世界的にも注目されていた “Precision Medicine Initiative” が発表され (Fig. 1)、この演説を皮切りに時代は従来の個別化医療から、プレジジョン・メディシン (精密医療) へと舵を切ることになった。わが国においてはこの流れに追随する形でがん対策基本法に基づき、2017 年 10 月に第 3 期の「がん

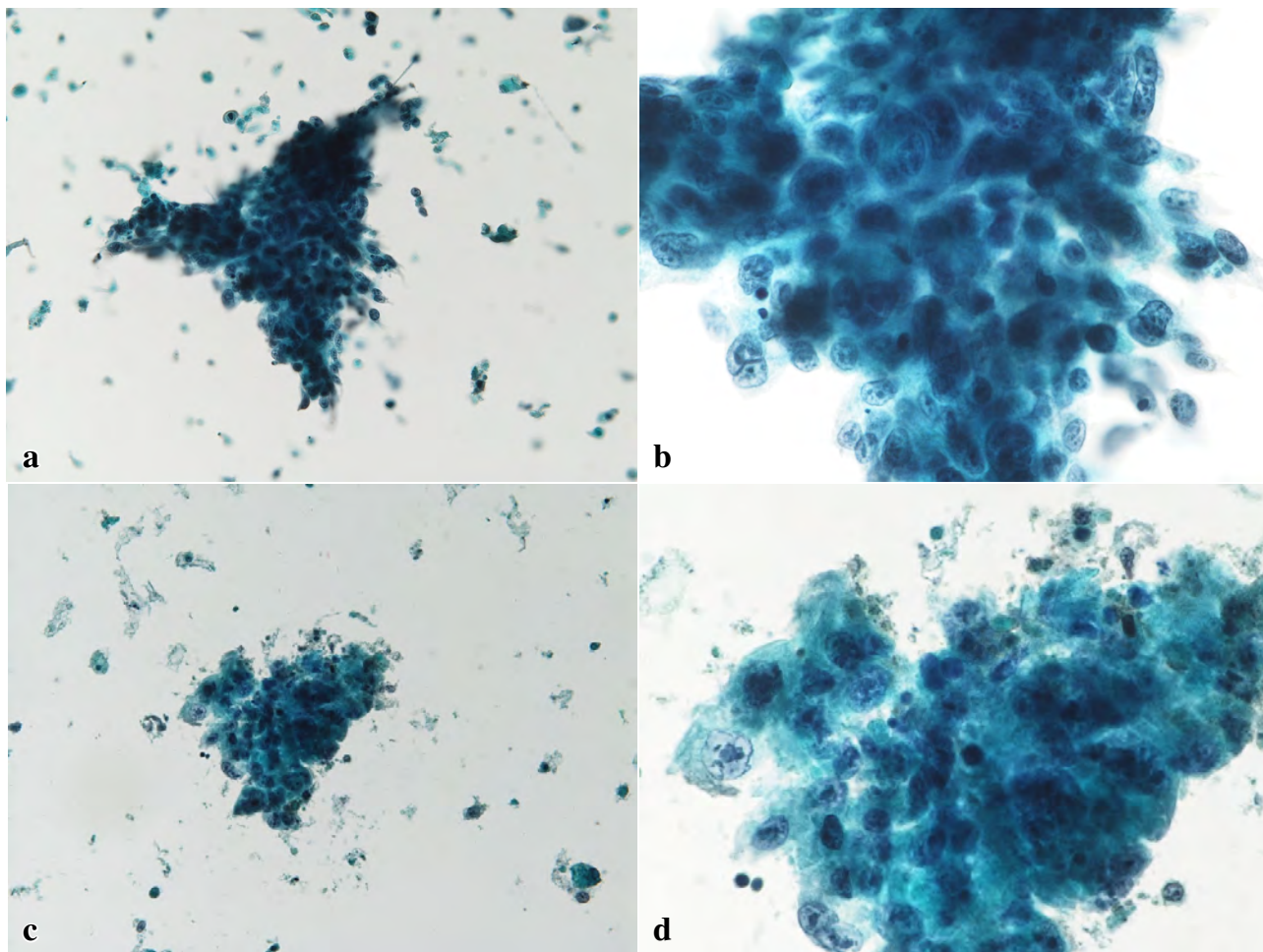


Photo. 2 肺癌切除標本の腫瘍剖面から得られた擦過細胞診の一例 (LBC 法), 最終病理組織診断による組織型は非角化型扁平上皮癌

- a: 重積傾向のある腫瘍細胞集塊 (SurePath™法, Papanicolaou 染色, $\times 20$)
- b: 短紡錘形の腫瘍細胞が密に増生 (SurePath™法, Papanicolaou 染色, $\times 60$)
- c: 細胞境界が明瞭で平面的な腫瘍細胞集塊 (ThinPrep™法, Papanicolaou 染色, $\times 20$)
- d: 平面的で大小不同の腫瘍細胞が不均一に配列 (ThinPrep™法, Papanicolaou 染色, $\times 60$)

対策推進基本計画」が閣議決定された。ゲノム医療を必要とするがん患者が全国どこにいてもがんゲノム医療が受けられる体制を構築するために、具体的には「がんゲノム医療中核拠点病院等の整備に関する指針」が厚生労働省から出され、そのベースとなる次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) を用いたマルチ遺伝子検査が導入される運びとなった。現在までに報告されている NGS を用いた遺伝子パネル検査の一覧を Table 3 に示した⁶⁾。その中でわが国において薬事承認されている検査は Foundation One® CDx, OncoGuide™ NCC Oncopanel, そしてオンコマイン™ Dx target test の3つになるが、この中でコンパニオン診断薬として指定されたのは、Foundation One® CDx (中外製薬株式会社) とオンコマイン™ Dx target test (ライフテクノロジー・ジャパン株式会社) の2つになる。2019 年日本肺癌学会の肺癌診療ガイドライン⁷⁾から病期 IV

期非小細胞肺癌の治療戦略を解説する樹形図の内容を Fig. 2 に引用した。現状としてはこのように組織型の鑑別や遺伝子診断などが、治療方針の決定に大変重要であることがよく理解できる。現在、局所進行・術後再発非小細胞肺癌の具体的な治療戦略を立てるために、その前提としては各種遺伝子異常の有無をコンパニオン診断薬で調べる必要がある。さらに PD-L1 (programmed cell death 1- ligand 1) の免疫染色が免疫療法の治療感受性の評価を目的に行われる。

IV. 臨床診断への適合と活用

それでは今後どのように日常臨床において LBC を含む細胞診材料を、実際の遺伝子解析に利用していくのか本題に移ることとする。2019 年度版肺癌診療ガイドライン (日本肺癌学会編)⁷⁾によれば、「原発性肺癌のバイオマー

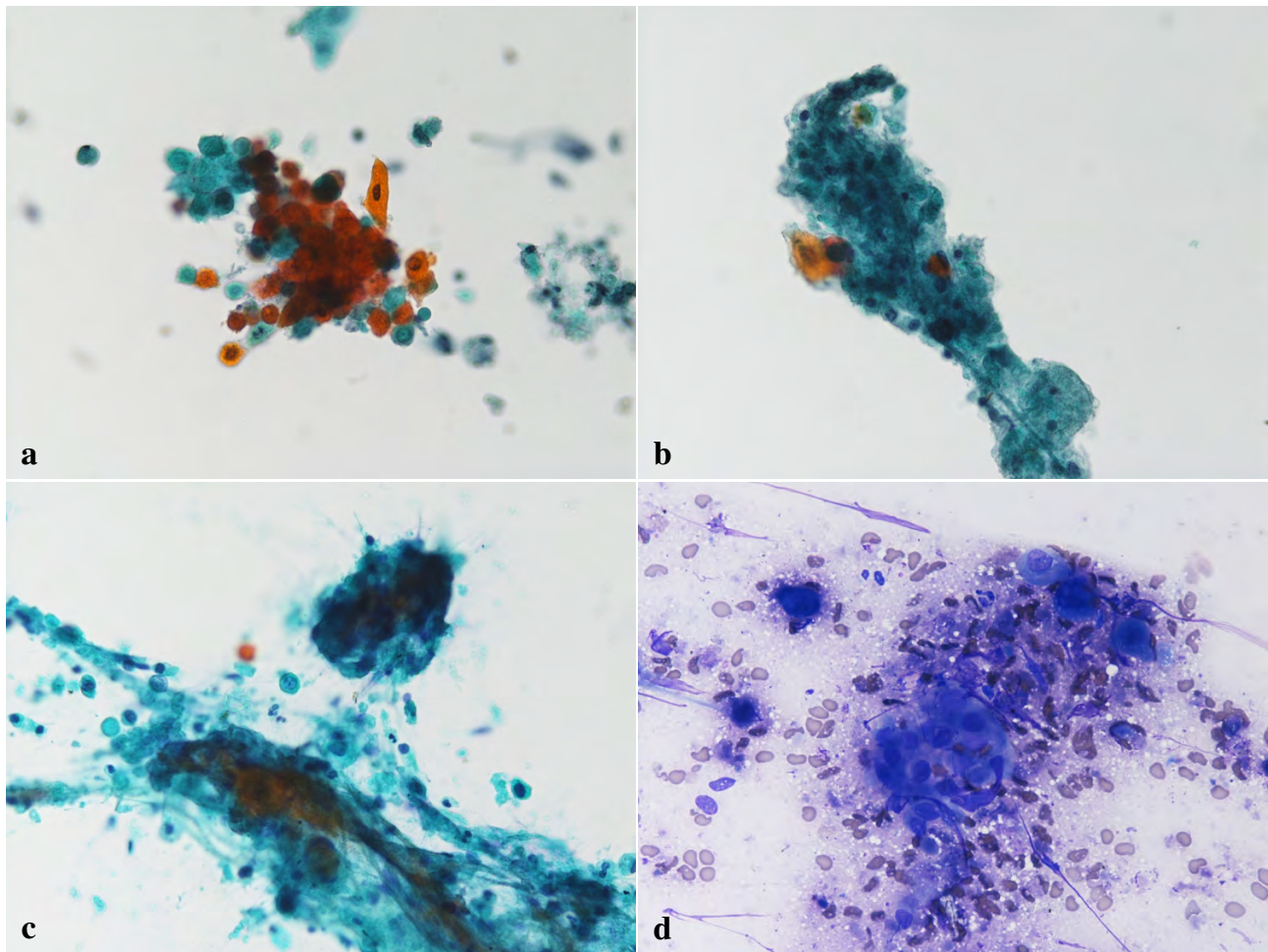


Photo. 3 角化型扁平上皮癌の一例

a: 切除標本の腫瘍断面から得られた擦過細胞診 (SurePath™法, Papanicolaou 染色, $\times 40$)

b: SurePath™法と比較して集塊内に壊死物を含む (ThinPrep™法, Papanicolaou 染色, $\times 40$)

c: 術前の気管支鏡下生検の際に採取した気管支洗浄液の細胞診, LBC 法と比較して背景に壊死物が目立つ (塗抹法 (従来法), Papanicolaou 染色, $\times 40$)

d: 術前の気管支鏡下生検の際に作製した迅速細胞診 (ROSE) 標本 (組織捺印による直接塗抹法, Diff-Quik® 染色, $\times 40$)

カー検索に, 細胞診検体は有用か?」という Clinical Question に対して, 「バイオマーカー検索に適した検体として, 細胞診検体を使用することを提案する.」という推奨に対し, 回答はエビデンスレベルが D でエビデンスが弱く, 現時点ではまだ十分に確信が持てない状況となっている. その理由としては「臨床試験での細胞診検体を用いた十分な検証がなされておらず, セルブロック標本を含めた細胞診検体を用いることは現時点では推奨されていない.」とある. しかしながら, 病理委員会と細胞診判定基準改訂委員会の計 17 名の委員の投票では, すべての委員が行うことを推奨もしくは行うことを弱く推奨とあり, 行わないことを推奨する委員は一人もいなかった. その理由としては, 「進行肺癌の治療方針決定のためのバイオマーカー検索では, 複数のバイオマーカー検査が必要であり, 限られた検体を

有効利用することが求められる. 採取された生検組織材料が少量である場合や, あるいは採取された検体が細胞材料のみの場合もあることから, 細胞診検体をバイオマーカー検索に利用することが推奨される.」と記載されている. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程 (日本病理学会編)⁸⁾では細胞診検体に関する記載はあるものの, まだ体腔液やその後に作製したセルブロックなどの利用に関する記述にとどまっている. その理由としては細胞材料に関するエビデンスの蓄積が, まだ十分でないという現状が反映されたと考える. ここ最近になって LBC を利用した遺伝子解析に関する論文や学術集会以での報告が増えてきた^{9,10)}. 2018 年 Matsuo ら¹¹⁾は肺癌の cell line を用いて EGFR (epidermal growth factor receptor: EGFR) の変異解析における, SurePath™のサイトリッチ™レッド保存液の最適な保

Table 2 本邦で承認された肺癌診療におけるコンパニオン診断薬の一覧（遺伝子パネル検査を除く、一部抜粋）

コンパニオン診断薬	使用目的	対応する医薬品
ヒストファイン ALK iAEP キット™	癌組織、細胞中に発現する ALK 融合蛋白の検出	アレクチニブ塩酸塩 クリゾチニブ
Vysis ALK Break Apart FISH プローブ キット™	癌組織、細胞中の ALK 融合遺伝子の検出	アレクチニブ塩酸塩 クリゾチニブ
コバス EGFR 変異検出キット v2.0™	癌組織/血漿 DNA 中の EGFR 遺伝子変異の検出	ゲフィチニブ エルロチニブ アファチニブマレイン酸塩 オシメルチニブメシル酸塩 ダコミチニブ水和物
PDL-1 IHC 22C3 pharmDx™	癌組織、細胞中の PD-L1 発現率の測定	ペンプロリズマブ
OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子 検出キット™	癌組織または細胞診検体から抽出した RNA 中の ROS1 融合遺伝子 mRNA の検出	クリゾチニブ
ペンタナ OptiView ALK (D5F3)™	癌組織または細胞中に発現する ALK 融合蛋白の検出	アレクチニブ塩酸塩 クリゾチニブ セリチニブ

ALK : anaplastic lymphoma kinase ; FISH : fluorescence *in situ* hybridization ; EGFR : epidermal growth factor receptor ; PDL-1 : programmed cell death 1- ligand 1 ; IHC : immunohistochemistry ; ROS1 : c-ros oncogene 1

Precision Medicine Initiative (概要)

■ Precision medicine とは

これまでの治療法の多くは「平均的な患者 (average patient)」向けにデザイン



遺伝子、環境、ライフスタイルに関する個人ごとの違いを考慮した予防や治療法を確立する

■ 目的

- より良いがんの治療の開発・提供
- 100 万人またはそれ以上のボランティアからなる全米研究コホートの創設
- Precision medicine に伴うプライバシー問題への対応
- 規制の近代化
- 官民連携

■ 予算 (2016 年度大統領予算案 2.15 億ドル)

Fig. 1 米国のオバマ前大統領の 2015 年一般教書演説におけるプレジジョン・メディシン (精密医療) の概略

存条件と、DNA の抽出方法に関する検討を報告した。またコントロールとしてホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin fixed paraffin embedded : FFPE) 標本からも抽出して、固定法の違いによる DNA の品質が比較検討されている。結論として LBC は 10% 中性緩衝ホルマリンと比べ、DNA の断片化が少なく良質であると報告した。2019 年 Akahane ら¹²⁾ は同じくサイトリッチ™ レッド保存液で 90 日間保存した培養細胞と、ERCP (胆膵内視鏡) で採取した膵癌細胞材料と、乳腺のアスピレーションで採取した残余細胞検体から、抽出した DNA を用いて NGS の解析を試

みた。LBC で固定した細胞材料からの解析は問題なく施行可能で、最長で 5 年間保存したサンプルからも解析が可能であったと報告した。このように少しずつ LBC を用いた遺伝子解析の有用性が報告され、今後の使用経験や解析データの蓄積によって、研究や臨床において LBC の使用機会がますます増えると考える。当教室では LBC の取り扱いについて Fig. 3 に示すような臨床での活用を想定してきた。目標としては気管支鏡下生検の際に使用した生検鉗子先端の洗浄液、いわゆる得られた細胞材料のうちの余剰検体を LBC で固定し活用できないかと考えた。従来の細胞形態学的な評価に加え、さらにはセルブロックを作製して、必要があれば免疫細胞学的な評価や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization : FISH)、そして直接そのセルブロックから核酸を抽出して遺伝子解析をするという流れである。この「臨床診断への適合と活用」として想定した仮説をもとに、2 つの実行可能性を検証する feasibility study^{13,14)} を行ったので紹介する。

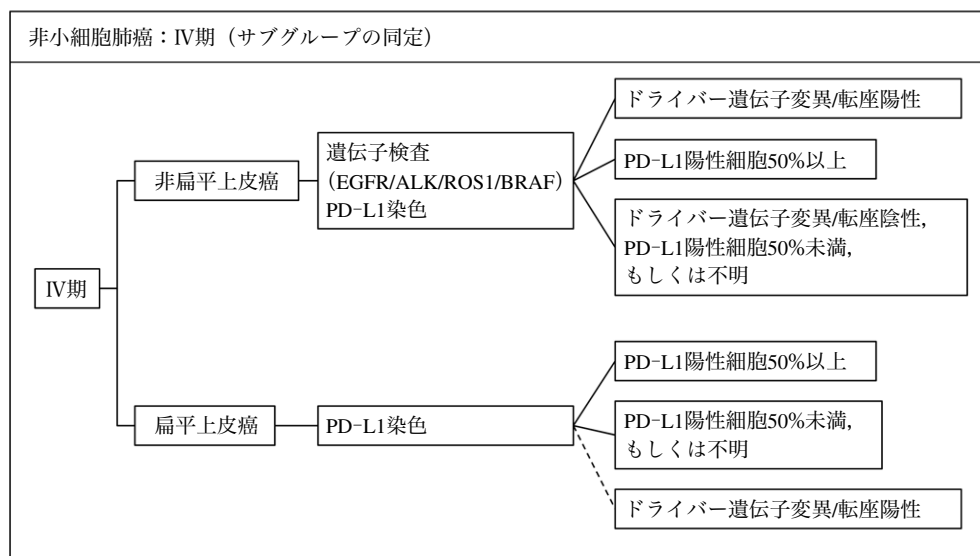
最初に検証実験 1 として、まずは十分な腫瘍細胞数を確保したうえで検討するため、肺癌手術で摘出した標本の腫瘍断面をヘラで擦過し、それをサイトリッチ™ レッド保存液内で洗浄して、肺腺癌 40 例から得られた LBC の擦過材料を対象とした。LBC 固定後は培養細胞用に開発された iPGel™ でゲル化して、その後パラフィン包埋によってセルブロックを作製した。本検証実験の結果は 2019 年の Diagnostic Cytopathology に掲載されたが¹³⁾、今回はコンパニオン診断にかかわる結果だけお示しする。検出された遺

Table 3 代表的な次世代シーケンス (NGS) を用いた遺伝子パネル検査の一覧 (文献 6 より引用, 一部改変)

遺伝子パネル検査	遺伝子数	解析方法	サンプル	TMB	FDA 承認	薬事承認	コンパニオン診断薬
MSK-IMPACT	468	キャプチャー法	T/N	測定可	あり	—	—
Today OncoPanel	464	キャプチャー法	T/N	—	—	—	—
CANCERPLEX	435	キャプチャー法	T	測定可	—	—	—
FoundationOne CDx	324	キャプチャー法	T	測定可	あり	あり	非小細胞肺癌, 悪性黒色腫乳癌, 結腸・直腸癌, 固形癌
OncoPrime	223	不明	T	—	—	—	—
PleSision	160	不明	T/N	—	—	—	—
NCC Oncopanel	114	キャプチャー法	T/N	測定可	—	あり	—
P5 report	52	不明	T	—	—	—	—
Oncomine Dx target test	46	アンプリコン法	T/N	—	あり	あり	非小細胞肺癌 EGFR, ALK, ROS1, BRAF
Guardant360	73	キャプチャー法	血液	—	—	—	—

NGS: next generation sequencer; TMB: tumor mutation burden; FDA: food and drug administration; T: tumor tissue only; T/N: tumor and normal tissue; EGFR: epidermal growth factor receptor; ALK: anaplastic lymphoma kinase; ROS1: c-ros oncogene 1; BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

肺癌診療ガイドライン2019年度版

**Fig. 2** 病期IV期非小細胞肺癌の治療戦略 (文献 7 より引用)

伝子異常の内訳を Fig. 4 に示した. EGFR 遺伝子変異は 40 検体中 20 検体 (50%) が陽性で, KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) 遺伝子変異は 4 検体 (10%) が陽性であった. それらを除く 40 検体中 16 検体に対して, さらにコンパニオン診断薬を用いて遺伝子解析を施行し, その結果 EML4-ALK (echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion protein) と ROS1 (c-ros oncogene 1) 融合遺伝子がそれぞれ 1 検体ずつ検出された. その他の 14 検体に対して BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) を認識する抗 BRAF (V600E) 抗体の免疫染色を行ったがすべて陰性で

あった. ALK の免疫染色においては日本肺癌学会のガイドライン¹⁵⁾によると, 実践的な腫瘍細胞量として 100 個以上あることが望ましいとされ, 最低限必要な細胞数として 1 個あればよいと記載されている. また ALK-FISH の判定においては最低限 100 個の細胞数が必要であるとされており, 免疫染色あるいは FISH のいずれにおいても細胞診検体を用いる際は, ガイドラインに従えば少なくとも 100 個の腫瘍細胞が必要であると考えられる. ALK 陽性肺癌 1 例の SurePath™法でのパパニコロウ染色標本と, コンパニオン診断薬であるヒストファイン ALK iAEP® キット (ニチレイバイオサイエンス社) による免疫染色の結果を Photo. 4

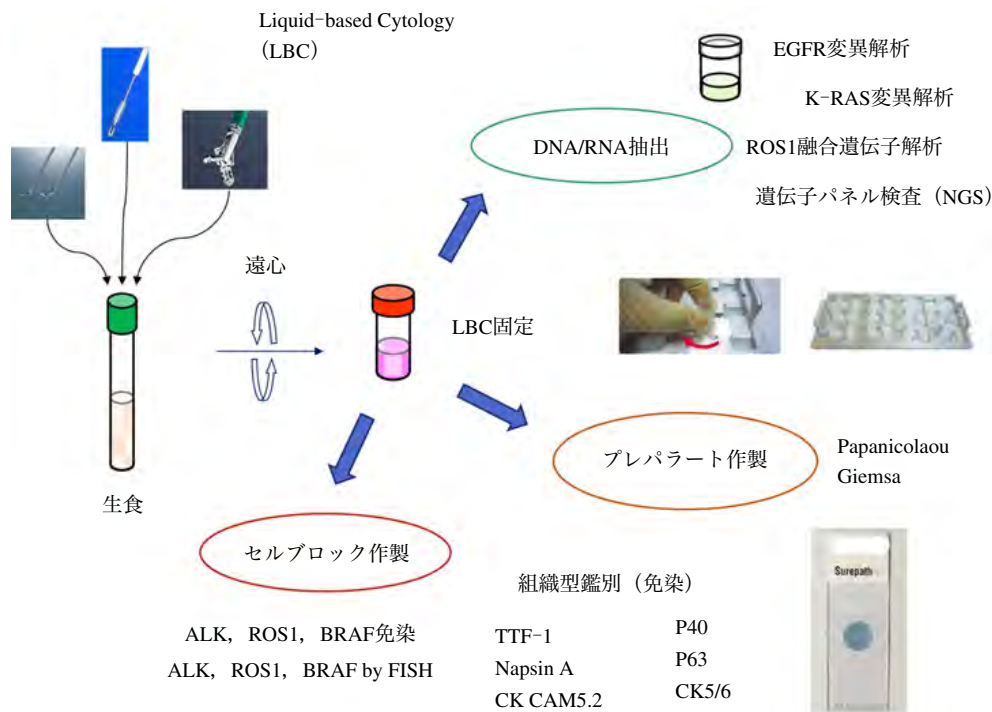
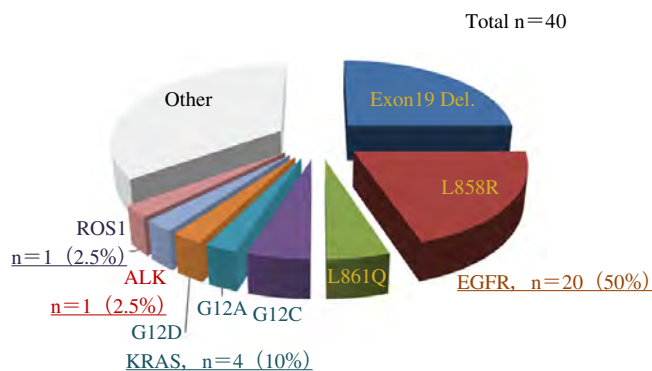


Fig. 3 肺癌診療における液状化細胞診検体 (LBC) を用いた今後の活用の可能性 (LBC の臨床診断への適応)

【結果：遺伝子異常の内訳】



Tanaka R, et al. *Diagn Cytopathol* 2019 ; 47 : 564-570.

Fig. 4 検証実験1の肺腺癌40例から得られたLBC擦過細胞診材料 (SurePath™法) を用いた遺伝子解析の結果と遺伝子異常の内訳

に示した。核小体が明瞭でほぼ均一な核型を有する腫瘍細胞が、大小の乳頭状および篩状構造を形成して出現している。一方、セルブロックからRNAを抽出し、コンパニオン診断薬である amoyDx の ROS-1 検出キットを用いて、ROS-1 陽性を確認した1例を Photo. 5 に示した。比較的に小型の腫瘍細胞の核には明瞭な核小体や、ところどころ核内封入体や核溝を有し、腫瘍細胞の集塊内に篩状構造がみられた。以上より検証実験1の結果では十分な腫瘍細胞数

を確保したうえで、治療を見据えたLBCによるコンパニオン診断は実行可能であると結論づけた。

続いて実際の臨床現場で得られたサンプルを用いて検証実験2を施行した。まずは対象検体の条件として気管支鏡検査の際に迅速細胞診 (rapid on-site evaluation : ROSE) を併用し、その際に腫瘍細胞が確実に採取されたことを確認した症例であることとした。前述の Fig. 3 で示したような手順により生検鉗子などの先端を生食で洗浄し、検証実験1と同様の処理方法でLBC固定後にセルブロックを作製した。このようにLBC固定後にセルブロックを作製した検体の総称をLBC-CB (cell black) と定義した。検証方法と手順を簡潔に解説するとLBC固定材料を4℃でしばらく冷蔵保存し、形態保持の最長保証期間6ヵ月を目安にLBC-CBを作製した。免疫染色の結果も考慮することで最終的に腺癌と診断された症例を対象として、それぞれ10μm×10枚の剥切切片からDNAを抽出し、コンパニオン診断薬であるコパス ver. 2 を用いてEGFR 遺伝子変異を解析した。また生検時の際に採取したFFPE組織材料、そして当日の検査開始前に採血をして採取分離した血漿も用いてそれらも同時に解析した。最終的にはそれぞれの検出率や変異箇所の一貫割合 (concordance) などを見て比較して検討した。本検証実験2の結果は2020年のDiagnostic Cytopathologyに掲載された¹⁴⁾。2015年のWHO分類に明記された生検組織・細胞検体の診断アルゴリズムの基準¹⁶⁾に沿って、対象

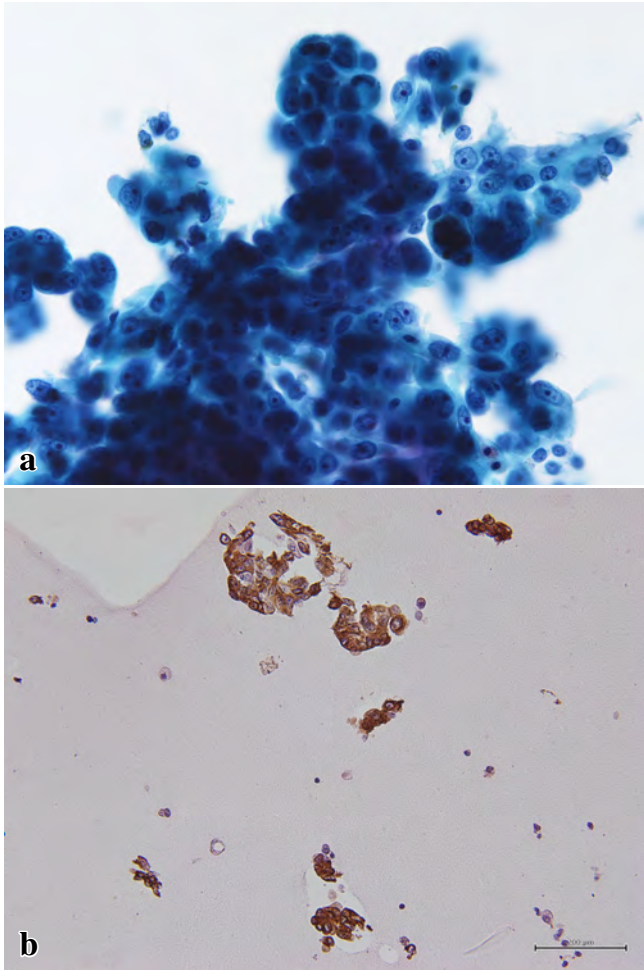


Photo. 4 ALK 融合遺伝子陽性肺癌の一例

a: 核小体が明瞭で、核にくびれを有する腫瘍細胞が、乳頭状および腺管様の集塊を形成 (SurePath™法, Papanicolaou 染色, $\times 40$)
 b: ヒストファイン ALK iAEP® キット (ニチレイバイオサイエンス社) を用いた免疫染色標本 ($\times 20$), ALK 融合蛋白陽性の腫瘍細胞が大小の集塊, 一部で崩れた腺腔を形成してゲル内に観察される。

の LBC-CB 検体の組織型分類を試みた。明らかに形態学的に腺癌や扁平上皮癌の特徴がない対象サンプルにおいては以下の免疫染色を行い、TTF-1 あるいは Napsin A が陽性の場合には favor adenocarcinoma, CK5/6 あるいは P40 が陽性の場合には favor squamous cell carcinoma と診断した。本検証実験に登録した症例は 34 例 34 検体あり, うち小細胞癌 1 例や甲状腺乳頭癌肺転移 1 例を含む, 不適格症例と判定した 4 例を除外し計 30 検体を対象とした。形態学的に診断が困難であった 5 例に対し, 前述の免疫染色を行い 3 例の favor adenocarcinoma を含む計 20 検体の腺癌を対象として, 前述のコンパニオン診断薬によって EGFR 遺伝子変異の解析を行った。LBC-CB の 20 検体中 8 検体 (40%) に

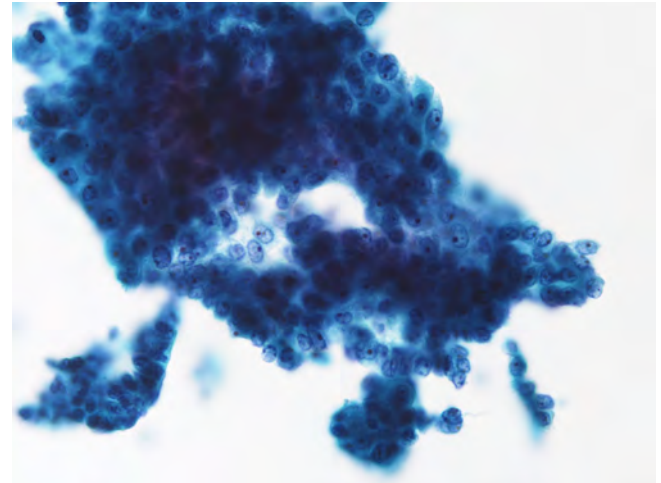


Photo. 5 ROS1 融合遺伝子陽性肺癌の一例, 比較的に小型の核を有する腫瘍細胞が, 立体的かつ一部に篩状構造を伴って集塊を形成 (SurePath™法, Papanicolaou 染色, $\times 40$)

いて EGFR 遺伝子変異が陽性と判定された。陽性群と陰性群の両群における背景因子の比較では, いずれの項目においても有意差を認めなかった (Table 4)。この LBC-CB を用いた解析では 1 切片あたりの腫瘍細胞数が極めて少数であるにもかかわらず, 結果的には DNA の抽出が可能でありしかも良好な検出率を示した。FFPE 組織検体, LBC-CB, そして血漿 (リキッドバイオブシー) の解析結果を Table 5 に示す。いずれのサンプルにおいても陽性群での EGFR 遺伝子の変異箇所は一致していた。LBC-CB の検出率が 40% (8/20) であるのに対し, FFPE 組織生検材料が 35% (7/20), 血漿 (リキッドバイオブシー) が 20% (4/20) で, LBC-CB では良好な検出率を示していた。LBC-CB で変異が検出されたが FFPE では非検出であった症例が 1 例あり, LBC-CB で Exon21 L861Q のマイナー変異が検出された症例であった。血漿 (リキッドバイオブシー) は FFPE や LBC-CB と比べ検出率が低く, LBC-CB で変異が陽性であった症例のうち, その半数で同一箇所に変異を認めていた。さらに追加実験として LBC-CB で EGFR 遺伝子変異が検出された 8 検体を用いて, $10\mu\text{m} \times 10$ 枚から DNA/RNA を抽出しオンコマイン™ Dx target test を施行した。しかしながら, すべての検体において検体量不足, あるいは DNA の増幅が不十分で解析困難であった。このことから NGS を用いた複数遺伝子の解析では, 検体内での腫瘍細胞含有率が大変重要であると改めて認識した。当院では呼吸器外科・呼吸器内科ともに症例を選んで, 気管支鏡下生検の際に迅速細胞診 ROSE を併用している。良質でアーチファクトの少ない細胞材料を採取するうえでも, 検体採取時の処理方法に注意をはらうことは大変重要である^{17,18)}。

Table 4 LBC-CB を用いた EGFR 遺伝子解析の結果による背景因子の比較 (文献 14 より抜粋, 一部改変)

Characteristics	LBC-CB		p value
	EGFR Positive (n = 8)	EGFR Negative (n = 12)	
Age			
Mean, years (mean $\pm$ SD)	75.4 $\pm$ 5.5	70.9 $\pm$ 12.9	0.370
Gender			
M/F	3/5	5/7	0.612
Smoking index			
<600/ $\geq$ 600	5/3	6/6	0.465
Clinical stage			
I / II	6	5	0.157
III / IV	2	7	
Cell count on CB			
No. of cells/one fragment	2.4 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 3.4	0.284
DNA concentration			
Mean, ng/ μ l (mean $\pm$ SD)	6.4 $\pm$ 3.2	10.5 $\pm$ 6.5	0.114

EGFR : epidermal growth factor receptor ; LBC : liquid-based cytology ; CB : cell block ; n : number of patients ; SD : standard deviation ; M : male ; F : female ; No. : number. *p < 0.05 was considered significant.

Table 5 EGFR 遺伝子解析における変異陽性症例の内訳とサンプル種別の検出率の比較 (文献 14 より抜粋, 一部改変)

Case	Subtype ^a	EGFR status		
		Tissue (FFPE)	LBC-CB (SurePath TM)	Liquid biopsy
1	ADC	No	Exon21 L861Q	No
2	ADC	Exon21 L858R	Exon21 L858R	No
3	ADC	Exon21 L858R	Exon21 L858R	Exon21 L858R
4	ADC	Exon21 L858R	Exon21 L858R	No
5	ADC	Exon21 L858R	Exon21 L858R	Exon21 L858R
6	ADC	Exon 19 del	Exon 19 del	No
7	Favor ADC ^b	Exon21 L858R	Exon21 L858R	Exon21 L858R
8	ADC	Exon21 L858R	Exon21 L858R	Exon21 L858R
Detection rate		35% (7/20)	40% (8/20)	20% (4/20)

^aSubtyped by a combination of liquid-based cytology, cell block results, and (if necessary) immunohistochemical staining. ^bNo clear adenocarcinoma morphology, but TTF1- and/or Napsin A-positive tumor cells (per immunohistochemical staining) ; EGFR : epidermal growth factor receptor ; LBC : liquid-based cytology ; CB : cell block ; ADC : adenocarcinoma ; No : no EGFR mutation detected ; del : deletion.

そして今後コンパニオン診断の精度向上のために、検体採取時の腫瘍含有率を高めることが大切で、ROSE の併用が望ましくそのための環境整備は大変重要である^{19,20)}。

V. ま と め

サイトリッチTMレッド保存液で固定した LBC 検体を用いて、治療計画を見据えた組織型の鑑別や、各種コンパニオン診断薬を使用した遺伝子解析が実行可能であった。現

状ではコンパニオン診断は FFPE 標本の使用が推奨されている。今後は細胞診検体の使用を積極的に検討していく際は、例えば LBC の固定液の種類や保存方法、そしてセルブロックの作製方法や、それらの検体の品質評価が大変重要である。そして細胞診検体からの解析は可能であるが、同時に腫瘍細胞含有率を評価する必要がある。腫瘍細胞含有率の低下を回避するために、ROSE を併用することが望まれる。今後ますます臨床と病理との緊密な連携が求められる。

著者は、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）教育講演 Web 開催（令和 2 年 6 月，横浜）にて発表した。

Abstract

The recent advent of targeted cancer therapy has led to widespread implementation of molecular testing such as next-generation sequencing. Companion diagnostics are very important for predicting response to and adverse events for specific chemotherapeutic agents. Liquid-based cytology (LBC) allows immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization, and polymerase chain reaction to be performed. In our laboratory, two feasibility studies were done to validate the use of LBC materials. First, cytological materials were obtained from surgical specimens of 40 lung adenocarcinomas (ADC) and fixed using CytoRich™ Red. Twenty cases (50%) were positive for epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement and c-ros oncogene 1 gene rearrangements were each identified in one case (2.5%) with companion diagnostics. Second, the Cobas™ EGFR Mutation Test ver. 2 was performed on each sample (LBC, formalin-fixed paraffin-embedded tissue or plasma) obtained by bronchoscopic examination from the 20 ADC with positive immunohistochemistry results. EGFR mutations were identified in eight cases (40%) using LBC, seven cases (35%) using formalin-fixed paraffin-embedded samples and four cases (20%) using plasma. These results suggest that LBC would be suitable for use in subtyping and molecular testing in clinical practice.

文 献

- 1) 田中良太. 液状化細胞診検体を用いたコンパニオン診断の現状. 日臨細胞会誌 2020 ; 59 (補冊 1) : 109.
- 2) 久布白兼行. 子宮頸部細胞診 2) 液状検体細胞診. 日産婦会誌 2010 ; 62 (9) : 194-199.
- 3) 松並平晋, 細根 勝. 細胞診検査を取り巻く環境変化—ベセスダシステムと液状化検体細胞診 (LBC) —. 医学検査のあゆみ 2016 ; 62 : 398-402.
- 4) 砂場慶子, 福家明美, 伊藤亜弥, 松岡 壯. 液状処理細胞診標本作製装置 2 社の比較検討. 日臨細胞会岡山会誌 2012 ; 31 : 15-18.
- 5) 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.
- 6) Wakai, T., Prasoon, P., Hirose, Y., Shimada, Y., Ichikawa, H., Nagahashi M. Next-generation sequencing-based clinical sequencing : toward precision medicine in solid tumors. Int J Clin Oncol 2019 ; 24 (2) : 115-122.
- 7) 日本肺癌学会, 編. 肺癌診療ガイドライン. 東京 : 金原出版 ; 2019.
- 8) 日本病理学会, 編. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱

い規程. 東京 : 羊土社 ; 2019.

- 9) Satoh, Y., Matsuo, Y., Kuba, T., Yamashita, K., Sawano, M., Tozaka, S., et al. EGFR mutation genotyping and ALK status determination in liquid-based cytology samples of non-small cell lung cancer. Virchows Archiv 2020 ; 476 : 753-762.
- 10) Yamaguchi, T., Akahane, T., Harada, O., Kato, Y., Aimonio, E., Takei, H., et al. Next-generation sequencing in residual liquid-based cytology specimens for cancer genome analysis. Diagn Cytopathol 2020 ; doi : 10.1002/dc.24511.
- 11) Matsuo, Y., Yoshida, T., Yamashita, K., Satoh, Y. Reducing DNA damage by formaldehyde in liquid-based cytology preservation solutions to enable the molecular testing of lung cancer specimens. Cancer Cytopathol 2018 ; 126 (12) : 1011-1021.
- 12) 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 : e0217724.
- 13) Tanaka, R., Sakamoto, N., Suzuki, H., Tachibana, K., Ohtsuka, K., Kishimoto, K., et al. Genotyping and cytomorphological Subtyping of lung adenocarcinoma based on Liquid-based Cytology. Diagn Cytopathol 2019 ; 47 : 564-570.
- 14) Tanaka, R., Ohtsuka, K., Ogura, W., Arai, N., Yoshida, T., Nakazato, Y., et al. Subtyping and EGFR mutation testing from blocks of cytological materials, based on liquid-based cytology for lung cancer at bronchoscopic examinations. Diagn Cytopathol 2020 ; 48 : 516-523.
- 15) 日本肺癌学会バイオマーカー委員会, 日本肺癌学会, 編. 肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き—第 3.1 版. 東京 : 日本肺癌学会 ; 2019.
- 16) Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors : Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. J Thorac Oncol 2015 ; 10 : 1243-1260.
- 17) 田中良太, 中里宜正, 吉野麗子, 呉屋朝幸, 湊 浩一. 肺野末梢病変に対する迅速細胞診を用いた気管支鏡下生検の有用性. 気管支学 2006 ; 28 : 557-560.
- 18) 田中良太. 胸部外科領域における最新の診断法—迅速細胞診—. 胸部外科 2007 ; 60 : 745-751.
- 19) Oki, M., Saka, H., Kitagawa, C., Kogure, Y., Murata, N., Adachi, T., et al. Rapid on-site cytologic evaluation during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosing lung cancer : a randomized study. Respiration 2013 ; 85 (6) : 486-492.
- 20) Trisolini, R., Cancellieri, A., Tinelli, C., de Biase, D., Valentini, I., Casadei, G., et al. Randomized Trial of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration With and Without Rapid On-site Evaluation for Lung Cancer Genotyping. Chest 2015 ; 148 : 1430-1437.

癌性腹膜炎，腹水貯留症例における腹水セルブロック法による治療方針決定について

小西 祥朝¹⁾ 利部 徳子¹⁾ 小野 巖²⁾ 石井 明²⁾
根 裕人²⁾ 山谷 千晴²⁾ 阿部 諒²⁾
中通総合病院産婦人科¹⁾，同 病理部²⁾

目的：癌性腹膜炎，腹水貯留症例において治療方針決定のために原発臓器の推定は重要である。今回，腹水貯留を認め腹水細胞診およびセルブロック法により原発臓器を推定し，治療方針を決定した症例について検討した。

方法：2017年1月から2018年4月までに癌性腹膜炎の診断で腹水を採取した5例を対象とした。腹水細胞診陽性例ではセルブロックを作製して免疫組織化学的染色を行い，原発巣を推定した。各症例の治療方針，治療方針決定までの日数，予後などを検討した。

成績：推定診断は卵巣癌4例，大腸癌1例。卵巣癌の4例中3例が化学療法を選択した。大腸癌，卵巣癌のそれぞれ1例が緩和医療を選択した。当科初診から治療方針決定までの期間は7~13日間（平均約10.6日間）であった。

結論：癌性腹膜炎，腹水貯留症例において腹水セルブロック法は，高齢者や試験開腹術が困難な進行症例では低侵襲かつ迅速に原発臓器を推定し，適切な診療科へ早期に紹介できる有用な検査である。

Key words : Ascites, Cell block, Carcinoma of unknown primary, Peritonitis Carcinomatosa

I. はじめに

原発巣不明の癌性腹膜炎，腹水貯留症例の診療において，原発臓器の推定は重要である。すなわち原発不明癌を鑑別として初期対応が必要であるが，すみやかに原発臓器を推定することは治療方針決定に必須である。癌性腹膜炎，

腹水貯留症例では組織採取のために試験開腹術を行う場合，肺血栓塞栓症や腸閉塞など周術期合併症のリスクがある。また，合併症のある高齢者では手術侵襲を考慮した対応が必要であり，手術の準備に時間を要する。

セルブロック法は液状の検体中に存在する細胞成分を集めてホルマリン固定し，パラフィン包埋ブロックを作製し組織切片と同様の標本作製を行うことで，組織像として観察可能となる検査法である¹⁾。組織型や原発臓器推定に有用との報告がある^{2,3)}。今回，多量の腹水貯留を認め癌性腹膜炎を疑い，セルブロック法により原発臓器を推定し，治療方針を決定した症例について後方視的に検討した。

II. 対象と方法

2017年1月から2018年4月までに癌性腹膜炎の診断で，腹水を検体として細胞診を施行した5例を対象とした。細胞診陽性例ではセルブロック法により免疫組織化学的染色

The cell block method is useful for predicting the primary site of cancer in cases of peritonitis carcinomatosa

Yoshitomo KONISHI¹⁾, M. D., Satoko KAGABU¹⁾, M. D., Iwao ONO²⁾, M. D., Akira ISHII²⁾, C. T., I. A. C., Hiroto KON²⁾, C. T., J. S. C., Chiharu YAMAYA²⁾, C. T., I. A. C., Makoto ABE²⁾, C. T., J. S. C.

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, ²⁾Department of Pathology, Nakadori General Hospital

論文刷請求先 〒 010-8577 秋田県秋田市南通みその町3の15
中通総合病院産婦人科 小西祥朝

令和元年 9 月 30 日受付

令和元年 11 月 5 日受理

Table 1 Patient background

No.	Age	Sex	complication	PS	Ascites	Tumor marker
1	69	female	colon cancer hypertension pulmonary thromboembolism	2	+++	CA125 : 3840 U/ml
2	76	female	glaucoma diabetes mellitus hypertension	2	+++	CA125 : 1100 U/ml
3	91	female	stomach cancer deep venous thrombosis	2	+	CA125 : 1380 U/ml
4	74	female	cataract glaucoma osteoporosis	2	+++	CA125 : 83.6 U/ml CA19-9 : 9342.9 U/ml CEA : 651.2 ng/ml
5	47	female	schizophrenia	2	+++	CA125 > 5000 U/ml

PS : performance status, +++ : massive ascites, + : small ascites

Table 2 Ascites cytology · cell block

No.	Cytology	CK7	CK20	ER	PgR	Others	Estimated primary organ
1	Adenocarcinoma	++	-	++			Ovary
2	Adenocarcinoma	++	-	++	-	CD117- DOG1-	Ovary
3	Adenocarcinoma	+++	+	+	+	TTF1- CEA-	Ovary
4	Adenocarcinoma	+	++			CDX2+	Colon
5	Adenocarcinoma	++	++	+	+	PAS-	Ovary

+++ : strongly positive, ++ : positive, + : partially positive

を行い、原発巣を推定した。セルブロック作製にはアルギン酸ナトリウム法を用いた⁴⁾。

手順：提出検体を3000 rpm 3分間遠心後、沈査を10%中性緩衝ホルマリンで6時間以上固定した。3000 rpm 3分間遠心後、上清を捨てて蒸留水で洗浄し3000 rpm 3分間遠心後、上清を捨て、1%アルギン酸ナトリウム0.5 mlを加え混和し、3000 rpm 3分間遠心後に上清を捨てる。これに1 M塩化カルシウムを2, 3滴加えて固化した。

各症例の推定原発臓器、推定診断、腫瘍マーカー、治療担当診療科、治療方針、初診から方針決定までの日数、転帰などを検討した。なお、当科では原発臓器検索のため、全例において、腫瘍マーカーを含めた血液検査、子宮頸部および内膜細胞診、乳癌、甲状腺癌のスクリーニング検査、上部・下部消化管内視鏡検査、全身CT検査、骨盤MRI検査を行っている。

III. 結 果

患者背景：平均年齢は71.4歳（47～91歳）、全例女性。

初診担当診療科は内科4例、救急科1例。全例とも腹水貯留のためperformance status (PS)は2の評価であり、全例でCA125の上昇を認めた (Table 1)。

腹水細胞診およびセルブロック法の結果：全例でadenocarcinomaの診断だが、細胞診所見のみでは原発巣の推定は困難だった。セルブロック法を用いた免疫組織化学的染色の結果、Case No. 1～3, 5が卵巣原発、Case No. 4が大腸原発の診断となった (Table 2)。

治療方針：推定診断は卵巣癌4例、大腸癌1例だった。3例 (Case No. 1, 2, 5) が化学療法、2例 (Case No. 3, 4) は緩和医療を選択した。

初診から方針決定までの日数：当科初診から治療方針決定までの期間は7～13日間 (平均約10.6日間) であった。

転 帰：化学療法を施行した3例中2例が症状増悪のため治療を中止し、緩和医療の方針となり、初診からそれぞれ4ヵ月、9ヵ月後に死亡した (Case No. 1, 2)。その他1例が治療継続中 (Case No. 5) である。また、緩和医療を選択した2例中1例が4ヵ月で死亡し (Case No. 4)、1例は緩和医療継続中 (Case No. 3) である (Table 3)。

Table 3 Treatment, outcome

No.	Estimated primary organ	Department of medical treatment	Treatment policy	Time to treatment decision (day)	Outcome
1	Ovary	Obstetrics and gynecology	Chemotherapy	13	Died after 4 month
2	Ovary	Obstetrics and gynecology	Chemotherapy	9	Died after 9 month
3	Ovary	Obstetrics and gynecology	BSC	11	Alive
4	Colon	Gastrointestinal surgery	BSC	13	Died after 4 month
5	Ovary	Obstetrics and gynecology	Transfer	7	During treatment

BSC : best supportive care

IV. 症 例

1) Case No. 1

主 訴：腹部膨満感

既往歴：結腸癌，高血圧症，肺血栓塞栓症

経 過：数ヵ月前からの腹部膨満感を主訴に内科を受診。CT検査で腹水貯留を認めたため精査目的で産婦人科紹介。CT/MRI検査では両側子宮付属器を含め，原発臓器の特定につながる腫瘍性病変はみられなかった。腹腔内に播種病変を認めた。上部，下部消化管内視鏡検査では異常所見を認めず。腹水細胞診で腺癌細胞を認め，セルブロック法で cytokeratin 7 (CK7)：陽性，cytokeratin 20 (CK20)：陰性，estrogen receptor (ER)：陽性。以上より結腸癌の再発は否定的，卵巣原発で矛盾なしという診断。

原発不明癌の診断で（卵巣癌または腹膜癌3期として）産婦人科で化学療法の方針。

〔細胞診所見〕(Photo. 1)

(Papanicolaou 染色)

クロマチンの増量した核腫大細胞が集塊状，孤立散在性に多数出現。細胞異型が強く原発巣は不明。

2) Case No. 2

主 訴：腹部膨満感

既往歴：糖尿病，高血圧症，緑内障

経 過：腹部膨満感を主訴に近医内科を受診。大腸癌疑いで当院消化器内科へ紹介，消化器外科に入院。精査目的で産婦人科紹介。CT/MRI検査では両側子宮付属器を含め，原発臓器の特定につながる腫瘍性病変はみられなかった。腹腔内に播種病変を認めた。上部，下部消化管内視鏡検査では異常所見を認めず。腹水細胞診で腺癌細胞を認め，セルブロック法でCK7：陽性，CK20：陰性，ER：陽性。また，CT/MRIの画像所見から gastrointestinal stromal tumor (GIST) を疑い，CD117 および DOG1 染色も施行したが陰性だった。以上より卵巣原発で矛盾なしという診断。

原発不明癌の診断で（卵巣癌または腹膜癌3期として）産婦人科で化学療法の方針。

〔細胞診・セルブロック検体の所見〕

(Papanicolaou 染色)

クロマチンの増量した核腫大細胞が集塊状，孤立散在性に多数出現。細胞異型が強く原発巣は不明。

3) Case No. 3

主 訴：腹部膨満感

既往歴：胃癌，深部静脈塞栓症

経 過：腹部膨満感を主訴に内科を受診。精査目的で当院消化器外科に入院。CT検査で腹水貯留を認めたため精査目的で産婦人科紹介。CT/MRI検査では両側子宮付属器を含め，原発臓器の特定につながる腫瘍性病変はみられなかった。腹腔内に播種病変を認めず。上部，下部消化管内視鏡検査では異常所見を認めず。腹水細胞診で腺癌細胞を認め，セルブロック法でCK7：強陽性，CK20：部分陽性，ER：部分陽性，progesterone receptor (PR)：部分陽性，TTF-1 陰性，CEA 陰性。以上より胃癌の再発は否定的，卵巣原発で矛盾なしという診断。

抗癌治療を希望されず，緩和医療の方針。

〔細胞診・セルブロック検体の所見〕

(Papanicolaou 染色)

クロマチンの増量した核腫大細胞が集塊状，孤立散在性に多数出現。細胞異型が強く原発巣は不明。

4) Case No. 4

主 訴：腹部膨満感

経 過：数ヵ月前からの腹部膨満感を主訴に救急外来を受診。CT検査で腹水貯留を認めたため精査目的で産婦人科紹介。CT/MRI検査では両側子宮付属器を含め，原発臓器の特定につながる腫瘍性病変はみられなかった。腹腔内に播種病変を認めた。原発不明癌の診断で入院精査。上部，下部消化管内視鏡検査では異常所見を認めず。CA19-9，CEA 高値であり，セルブロック法でCK7：部分陽性，CK20：陽性，caudal-type homeobox (CDX) 2：部分陽性。以上より大腸癌を推定。

他院腫瘍内科を紹介したが抗癌治療を希望されず，緩和医療の方針。

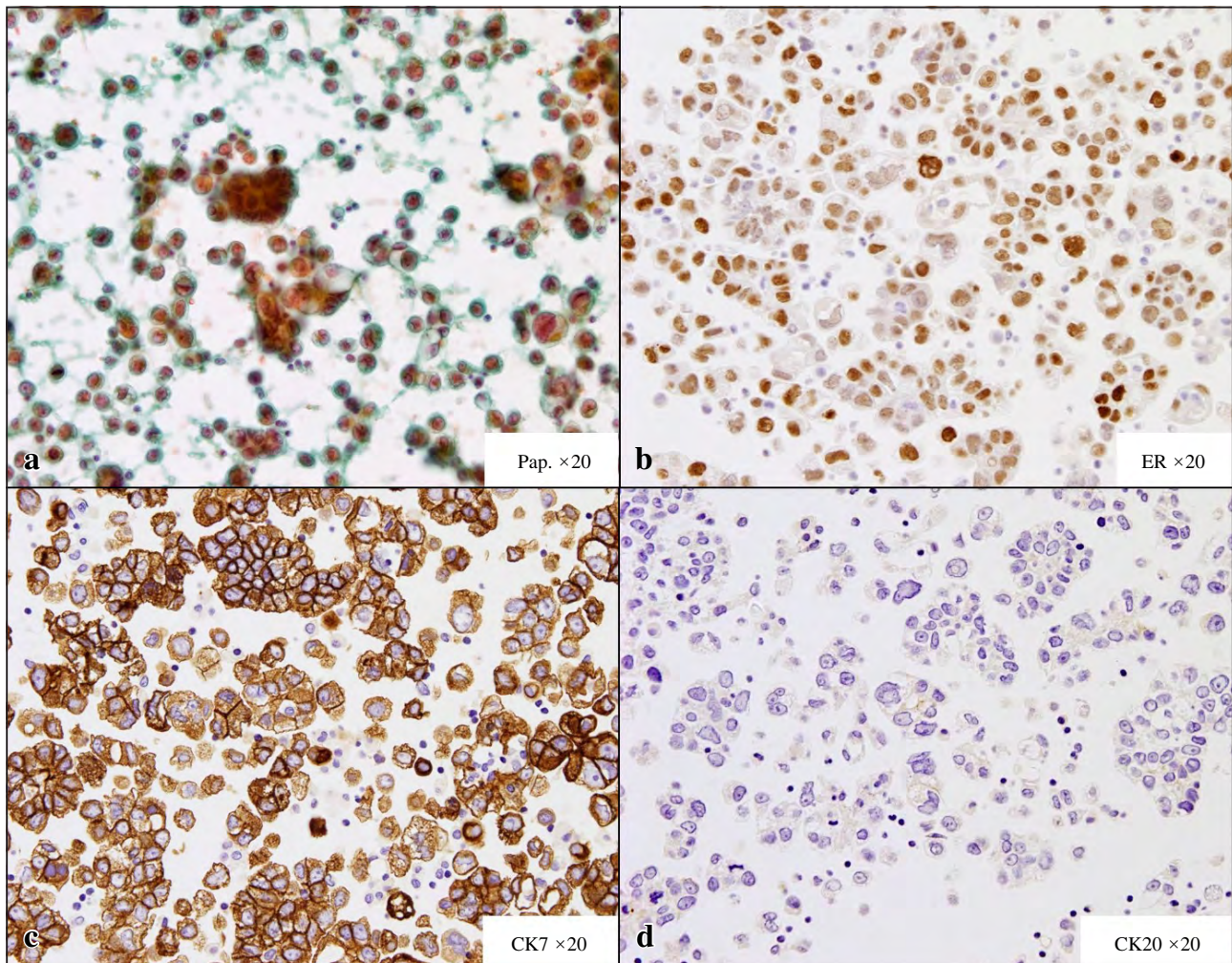


Photo. 1 Case 1. Ascites cytology and cell-block. Pap. Staining : positive (a, $\times 20$). Immunohistochemical staining, positive : estrogen receptor (ER) (b, $\times 20$), cytokeratin (CK) 7 (c, $\times 20$), negative : cytokeratin (CK) 20 (d, $\times 20$).

〔細胞診・セルブロック検体の所見〕 (Photo. 2)

(Papanicolaou 染色)

核密度の高い細胞集塊が多数出現。核は偏在傾向で、細胞質は粘液を有している。

5) Case No. 5

主 訴：腹部膨満感

経 過：3 ヶ月前からの腹部膨満感を主訴に近医内科を受診。腹部超音波検査で腹水貯留を認めたため精査目的に産婦人科紹介。CT/MRI 検査では両側子宮付属器を含め、原発臓器の特定につながる腫瘍性病変はみられなかった。腹腔内に播種病変を認めた。上部、下部消化管内視鏡検査では異常所見を認めず。セルブロック法で CK7：陽性、CK20：陽性、periodic acid schiff (PAS)：陰性、ER：部分陽性、PR：部分陽性。以上より卵巣癌を推定。

卵巣癌、癌性腹膜炎の診断で他院産婦人科紹介の方針。

〔細胞診・セルブロック検体の所見〕 (Photo. 3)

(Papanicolaou 染色)

クロマチンの増量、広い細胞質を有する異型細胞からなる小型の集団が一部集塊状に散在。

V. 考 察

原発不明癌とは、十分な検索にもかかわらず原発巣が不明で組織学的に転移巣と判明している悪性腫瘍と定義されている⁵⁾。頻度は1～5%程度と報告されている^{6,7)}。最終的に病理解剖で判明する頻度の高い原発臓器は、膵臓、胆道、肝臓であるが、病理解剖後も原発巣が不明の患者も20～50%存在する^{8,9)}。一般的に予後不良であり、生存期間中央値は6～9ヵ月とされる¹⁰⁾。臨床像ならびに病理学的評価から治癒可能な患者群、予後良好な患者群は原発不明癌全体の15～20%を占め、これらの患者群を確実に抽出すること

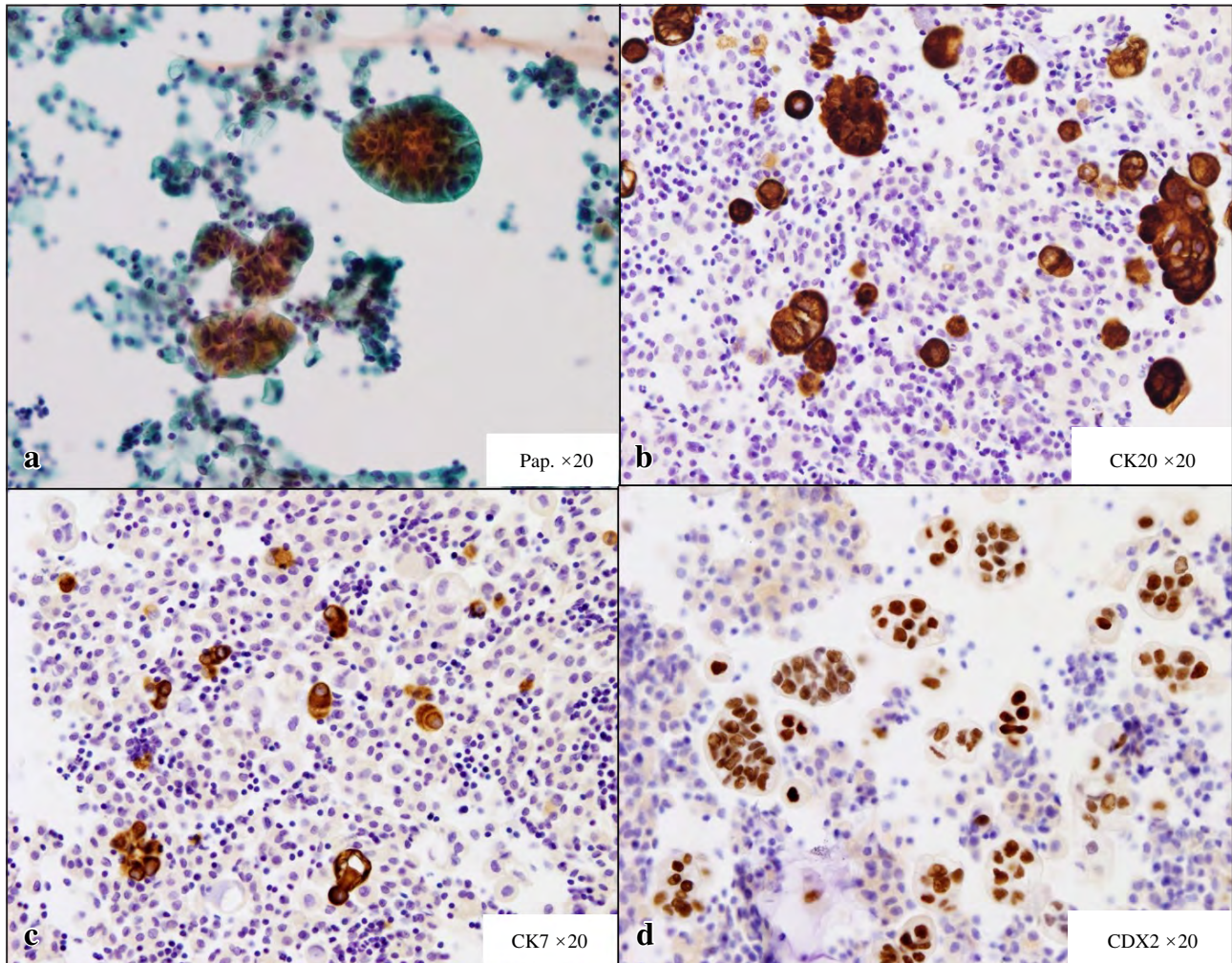


Photo. 2 Case 4. Ascites cytology and cell-block. Pap. Staining : positive (a, $\times 20$). Immunohistochemical staining, positive : cytokeratin (CK) 20 (b, $\times 20$), partially positive : cytokeratin (CK) 7 (c, $\times 20$), caudal-type homeobox (CDX) 2 (d, $\times 20$).

が極めて重要である。以上の記載は「原発不明がん診療ガイドライン」(以下ガイドラインと略)¹¹⁾に記載されており、2010年に初版が発行され、原発不明癌に対する系統的な検査や治療について記載したガイドラインとして臨床的意義は大きいものであった。

婦人科外来の日常診療において「明らかな骨盤内腫瘍を認めない腹水貯留症例」を経験することはまれではない。臨床的に明らかな卵巣癌、癌性腹膜炎症例に対しては「staging laparotomy/primary debulking surgery」または「試験開腹術」、開腹手術困難例では「術前化学療法を施行した後に interval debulking surgery」を行うなどいくつかの選択肢がある¹²⁾。「明らかな骨盤内腫瘍を認めない癌性腹膜炎、腹水貯留症例」においては、腹膜癌を鑑別しつつ原発不明がん疑いとして初期対応が必要である。腹水細胞診で良性・悪性の診断は可能であるが、確定診断のためには腫瘍組織採取とその病理学的検索が必要である。ガイドライ

ンにも「病理学的検索は原発不明がんの原発巣同定に有用」とされ、推奨度：強と記載されている。しかし、試験開腹術を行う場合、肺血栓塞栓症や腸閉塞など周術期合併症のリスクがあることや、PS不良な症例、合併症の多い高齢者では手術を回避せざるを得ないこともある。推定原発臓器、組織型により担当診療科、治療方針が変わるため、病理学的検索は有用かつ必須であるが、一方では上記のように手術侵襲を考慮し、治療方針決定に難航する症例も多い。初診から短期間に診断して治療方針を決定するのが困難である場合、全身状態が悪化して治療開始のタイミングを逸することもある。

セルブロック法は液状の検体中に存在する細胞成分を集めてホルマリン固定し、パラフィン包埋ブロックを作製し組織切片と同様の標本作製を行うことで、組織像として観察可能となる検査法である¹⁾。稲田らは原発不明癌、癌性腹膜炎に対して腹水セルブロック法によって卵巣癌と推定

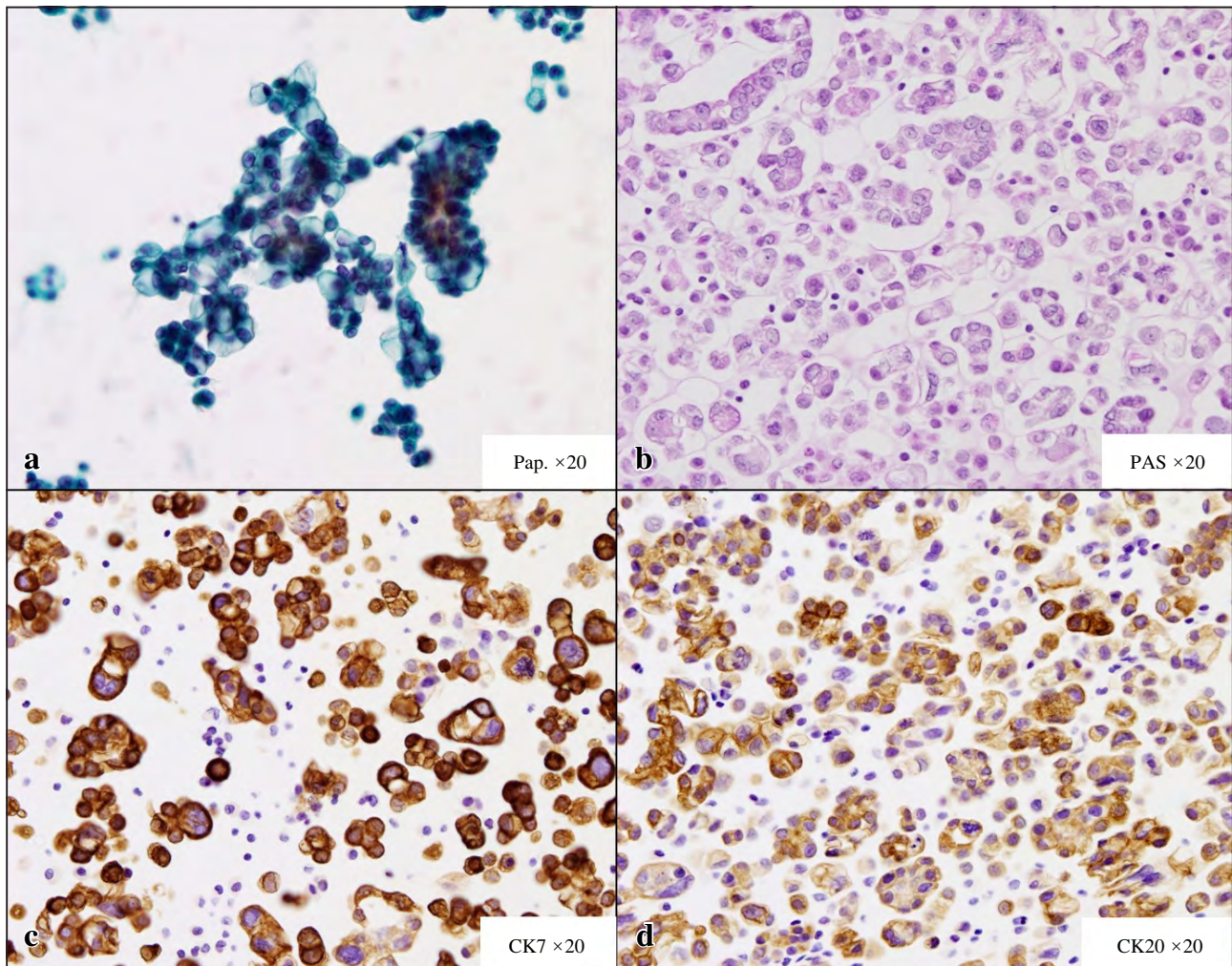


Photo. 3 Case 5. Ascites cytology and cell-block. Pap. Staining : positive (a, $\times 20$). Immunohistochemical staining, positive : cytokeratin (CK) 7 (c, $\times 20$), cytokeratin (CK) 20 (d, $\times 20$), negative : Periodic acid-Schiff (PAS) (b, $\times 20$).

診断し治療に結び付いた症例を報告しており、腹水セルブブロック法による診断の有用性を強調している³⁾。また、小堺らは腹水セルブブロック法による再発、転移の診断を行い、その有用性を報告している²⁾。いずれの報告でも免疫組織化学的染色により原発臓器の診断がつき、その後の治療方針決定に有用であったと結論している。セルブブロック法は平成 28 年度の診療報酬改定で細胞診として認められた。平成 30 年度の改定では病理組織標本に位置付けられ、免疫組織化学的染色を前提とした検査法であることが明確となった。ただし今回の改定では「悪性中皮腫を疑う患者または組織切片を検体とした病理組織標本が作製困難な肺悪性腫瘍を疑う患者に対して、穿刺吸引等により採取した検体を用いてセルブブロック法により標本作製した場合に算定する」と限定されている。

「癌性腹膜炎、腹水貯留症例」では、穿刺により採取した腹水を検体としてセルブブロック法で作製した標本をもと

に、免疫組織化学的染色の組み合わせを用いることで、原発臓器を推定しうる。ガイドラインにも免疫組織学的検索は原発不明癌の原発巣同定に有用と記載されている。CK7 と CK20 の組み合わせと他臓器特異性の高いマーカーの検索が有用である¹³⁾。本検討は全例女性であり、CK7 と CK20 以外にも mammaglobin, Gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15), paired-box gene 8 (PAX8), Wilms tumor-1 (WT1) などとの組み合わせで乳癌との鑑別もある程度可能であり、診断に有用である¹⁴⁾。開腹手術を回避しつつ、侵襲の少ない穿刺による腹水検体で組織型を推定可能なセルブブロック法は、日常臨床の現場で重要性が増している。特に婦人科領域では、卵巣癌や腹膜癌においては進行症例に対しても術前化学療法が奏功する症例もあり、消化器癌やその他の癌との鑑別を行う意義は大きいと考える。当科では原発巣不明の癌性腹膜炎、腹水貯留症例の初診時には、可能なかぎり腹腔穿刺（あるいはダグラス窩穿

刺)を行い、腹水細胞診を施行している。また、2017年1月以降は積極的にセルブロック法を併用し、免疫組織化学的染色による原発臓器の推定を試みてきた。初診時に子宮頸部および内臓細胞診を施行し、CT/MRI検査などの画像検査、腫瘍マーカー検査、乳癌検診および消化管内視鏡検査結果を並行して全身検索を行っており、初診から平均10.6日で治療方針が決定された。本検討では5例すべての腹水細胞診で陽性所見を認めたが、単独では原発臓器の推定は困難であった。上記の全身検索の結果に加えて、セルブロック法による免疫組織化学的染色の結果が後押しとなり、5例中4例が卵巣癌、1例が大腸癌の推定診断となった。原発巣不明の癌性腹膜炎、腹水貯留症例、すなわち進行例においては治療担当診療科の決定と治療方針決定までの期間が長期化することがある。初診の担当診療科が、しるべき診療科へ紹介し追加検査などを経て方針決定となるため、推定診断の遅れが治療開始の遅れにつながるというデメリットがある。ガイドラインにおける診断・治療の原則として①治療可能な患者群、予後良好な患者を見落とさない、②たとえ原発巣がなくても、臨床的にあるがん腫からの転移を強く疑えば、そのがん腫に基づく治療を行う、③過剰な検査により治療開始を遅らせない、の3点が基本となるため、迅速な診断の補助としてセルブロック法は非常に有意義な検査である。

ガイドラインでは、「女性で腹膜転移のみ有しCA125の上昇している原発不明がんに対する治療」は「腹膜がんとして3期卵巣がんの治療に準じた治療を推奨」されている。つまり、卵巣癌は否定的だが、他の原発巣も明らかでない場合、原発性腹膜癌の可能性に留意した検査、治療計画を立てる必要があり、本研究の症例1, 2, 3, 5は臨床経過および各種検査から卵巣癌3期としての対応をした。病理解剖を行わなかったため、最終的な診断は不明であるが、できるだけ短期間に原発巣を推定することは速やかな治療開始のために重要である。今後、症例を蓄積することで化学療法施行後に手術可能症例があれば、セルブロック法の推定精度を検討できるものと考ええる。

原発不明癌、腹水貯留症例の原発巣検索期間について検討された臨床試験やレビューは存在しない。ガイドラインには1ヵ月以内に原発巣検索を行うこと、1~2週間での初期評価で原発巣が同定できない場合は、早期に癌専門施設へ紹介することが推奨されている¹¹⁾。また、可能な限り早急に検査を進め治療を開始する努力が必要とも記載されている。当科では初診時に腹腔穿刺（またはダグラス窩穿刺）を行い、腹水細胞診と同時にセルブロック法による免疫組織化学的染色を行うことで、数日後には原発臓器を推定できた。また、CT/MRI検査、乳癌検診、消化管内視鏡

検査も可能な限り早急に行うことで極めて短期間に治療方針を決定することができたが、関係各科の協力体制と連携が重要であることは言うまでもない。本検討は癌性腹膜炎、腹水貯留症例の原発巣検索期間について検討した最初の報告となるが、原発巣の早期推定診断が必ずしも良好な予後につながるものではない。しかし、抗癌治療またはBest Supportive Careのいずれの治療を選択するにしても「早期診断と病状説明、適切な診療科への紹介」が重要なのは癌診療を行う際の基本である。

VI. 結 論

癌性腹膜炎、腹水貯留症例において腹水セルブロック法による原発臓器の推定は、高齢者や試験開腹術が困難な進行症例では低侵襲かつ迅速な検査法として速やかに患者へ情報提供ができる。適切な診療科へ紹介が可能となり、治療方針決定に有用である。2020年4月より肺悪性腫瘍、胃癌、大腸癌、卵巣癌、もしくは悪性リンパ腫を疑う患者に対してもセルブロック法の免疫染色が保険請求可能となった。さらに「原発不明がん、癌性腹膜炎」の原発巣検索に対してもセルブロック法が保険収載されることを望む。

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57回日本臨床細胞学会秋期大会(2018年11月、横浜市)において報告した。

Abstract

Objective : The primary site of cancer was estimated by ascites cytology and immunohistochemical staining by the cell block method (CB), and the time until a treatment plan could be decided for the cancer of unknown primary (CUP) was examined.

Study Design : This was a retrospective analysis of ascites cytology and CB in a total 5 patients who underwent ascites cytology for the diagnosis of CUP between January 2017 and April 2018. Immunohistochemical staining was performed in cases with a positive ascites cytology. The treatment policy for each case, the interval (in days) to decision about the treatment policy, the prognosis, etc., were examined.

Results : The predicted diagnosis was ovarian cancer in 4 of the 5 cases, and colon cancer in the remaining 1 case. The period from the first visit to our department to decision on the treatment plan was 7-13 days (average, 10.6 days).

Conclusion : CB is useful, minimally invasive tool for rapid prediction of the primary site of cancer in cases of CUP.

文 献

- 1) 伊藤 仁, 小山田裕行, 加戸伸明, 芹澤昭彦, 宮嶋葉子. セルブロック作製法と特殊染色 (胸腹水). 病理と臨 2010 ; 28 : 1136-1140.
- 2) 小堺智文, 西澤和世, 石田章子, 米田 傑, 太田浩良. 胸膜転移の診断に胸水セルブロックを用いた免疫組織化学的検討が有用であった皮膚血管肉腫の 1 例. 日臨細胞会誌 2013 ; 52 : 459-465.
- 3) 稲田加奈子, 加藤明彦, 田代幸恵, 寺原賢人. 原発不明の癌性腹膜炎に対し, 腹水セルブロックによる補助診断が有用であった原発性卵巣漿液性腺癌と思われる 1 例. 鹿児島産婦会誌 2015 ; 23 : 12-17.
- 4) 佐野順司, 吉本尚子, 溝口良順, 齋藤みち子. アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法の有用性についての検討. 日臨細胞会誌 2005 ; 44 : 291-297.
- 5) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Occult primary (Cancer of unknown primary). Version 2. 2016. www2.tri-kobe.org/nccn/guideline/occult/english/occult.pdf (最終アクセス日 2019.9.20)
- 6) Calum Muir, M. B. Cancer of unknown primary site. Cancer 1995 ; 75 : 353-356.
- 7) Abbruzzese, J. L., Abbruzzese, M. C., Hess, K. R., Raber, M. N., Lenzi, R., Frost, P. Unknown primary carcinoma : natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. J Clin Oncol 1994 ; 12 : 1272-1280.
- 8) Blaszyk, H., Hartmann, A., Bjornsson, J. Cancer of unknown primary : clinicopathologic correlations. APMIS. 2003 ; 111 : 1089-1094.
- 9) Bugat, R., Bataillard, A., Lesimple, T., Voigt, J. J., Culine, S., Lortholary, A., et al. Summary of the Standards, Options and Recommendations for the management of patients with carcinoma of unknown primary site (2002). Br J Cancer 2003 ; 89 : 59-66.
- 10) Pavlidis, N., Briasoulis, E., Hainsworth, J., Greco, F. A. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. Eur J Cancer 2003 ; 39 : 1990-2005.
- 11) 日本臨床腫瘍学会, 編. 原発不明がん診療ガイドライン 改訂第 2 版. 東京 : 南江堂 ; 2018.
- 12) 日本婦人科腫瘍学会, 編. 卵巣がん治療ガイドライン 2015 年版. 東京 : 金原出版 ; 2015.
- 13) 森永正二郎. 原発不明癌の免疫染色. 病理と臨 2017 ; 35 : 137-151.
- 14) Conner, J. R., Hornick, J. L. Metastatic carcinoma of unknown primary : diagnostic approach using immunohistochemistry. Adv Anat Pathol 2015 ; 22 : 149-167.

子宮頸がん集団検診における AGC (atypical glandular cells) 症例の追跡結果

森村 豊^{1,2)} 羽野 健汰¹⁾ 栗田和香子¹⁾ 寅磐 亮子¹⁾
 神尾 淳子¹⁾ 佐藤 哲³⁾ 植田 牧子³⁾ 加茂 矩士³⁾
 遠藤 雄大³⁾ 藤森 敬也³⁾

公益財団法人福島県保健衛生協会¹⁾, 羽生総合病院婦人科²⁾, 福島県立医科大学医学部産科婦人科学講座³⁾

目的: 子宮頸がん集団検診における AGC 例の追跡結果を調査し, AGC 判定の意義を明らかにする.

方法: 2011~2016 年の子宮頸がん集団検診での AGC 判定例の組織診結果, 診断確定までの観察期間を調査した. AGC をベセスダ方式に則って EC, FN と EC, NOS や EM, NOS, 由来不明 FN と由来不明 NOS の 5 つに細分類し比較した.

成績: AGC は 232 例で頻度は 0.05%, 細胞診異常例の 5.4% を占めた. 要治療病変は 58 例 25% にみられた. EC 群 (EC, FN+EC, NOS) 111 例では CIN3 が 3 例, 浸潤扁平上皮癌 1 例, AIS 10 例, 浸潤性頸部腺癌 7 例が確認された. EM, NOS 103 例では内膜異型増殖症 1 例, 体癌 23 例, 卵巣癌 2 例が確認された. EC 群では 6.4 月と EM の 4.5 月に比して病変検出までの期間が長かった.

結論: AGC の判定に際しては, その由来や性状を記載することが, 患者の適切な管理のために重要である. EC や EM の記述で, 頸部や内膜の精査方法が示される. 特に EC 例では長期の経過観察が重要である.

Key words : Atypical glandular cells, Uterine cervical cytology, Histological results, Cervical and endometrial lesion

I. はじめに

子宮頸部細胞診による子宮頸がん検診は, 子宮頸部病変の早期発見に有用な方法で, 広く普及している. 頸部細胞診異常の多くは, 扁平上皮病変由来であるが, 腺由来の病変を捉える場合もある. 子宮頸部細胞診の報告様式であるベセスダ方式では, 腺系の異常上皮細胞を, 異型腺細胞 atypical glandular cells, (AGC), 内頸部上皮内腺癌 adenocarcinoma *in situ*, (AIS), 腺癌 adenocarcinoma と報告する¹⁾. AGC は反応性や修復性変化を超えた異常を認めるが, AIS や腺癌の特徴を欠く場合に用いられる. 内頸部や子宮内膜, 時には子宮外病変に由来することもある²⁾. 反応性, 修復性変化などの良性的病変から, AIS や浸潤性腺癌, 時には扁平上皮病変など多彩な病変を反映していることが多い¹⁾. AGC からは 20~50% に cervical intraepithelial

Follow-up results in patients with atypical glandular cells detected on uterine cervical cancer screening

Yutaka MORIMURA^{1,2)}, M. D., Kenta HANO¹⁾, C. T., I. A. C., Wakako KURITA¹⁾, C. T., I. A. C., Ryoko TORAIWA¹⁾, C. T. I. A. C., Junko KAMIO¹⁾, C. T., I. A. C., Tetsu SATOH³⁾, M. D., Makiko UEDA³⁾, M. D., Norihito KAMO³⁾, M. D., Yuta ENDOH³⁾, M. D., Keiya FUJIMORI³⁾, M. D.

¹⁾Fukushima Preservation Service Association of Health

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Hanyu General Hospital

³⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical University School of Medicine

論文別刷請求先 〒960-8550 福島県福島市方木田字水戸内 19 の 6 公益財団法人福島県保健衛生協会 森村 豊

令和 2 年 3 月 2 日受付

令和 2 年 3 月 31 日受理

neoplasm (CIN), AIS や浸潤癌などの要治療病変を認めると報告されている³⁻⁷⁾。今回、当施設での AGC 症例の組織学的診断や経過を明らかにした。その結果から、多彩な症例が含まれる AGC 症例の適切な管理に向けて、AGC 判定の意義や報告様式を検討した。

II. 対象と方法

福島県保健衛生協会では、福島県内全市町村の委託を受け県内のすべての子宮頸がん集団検診の検体を収集し判定している。細胞の採取は、スパーテルか頸管ブラシで、綿棒は用いていない。従来法で塗抹し 95% アルコールで固定し標本を作製している。

細胞診の判定にはベセスダ方式を用いている。AGC 判定例については、患者に対する管理法を明らかにするべく、ベセスダ方式による細分類を付記している¹⁾。異型腺細胞の由来を推定し、「内頸部 endocervix (AGC-EC)」と「特定不能な異型子宮内膜 endometrium, not othewised specified (AGC-EM, NOS, 以下 EM, NOS)」に区別をしている。さらに、異型内頸部細胞については、「腫瘍を示唆する異型内頸部細胞 (favor neoplastic, AGC-EC, FN, 以下 EC, FN)」または「特定不能な異型内頸部細胞 (AGC-EC, NOS, 以下 EC, NOS)」を付記している。内頸部由来か内膜由来か判定できない異型腺細胞は「腫瘍を示唆する異型腺細胞 AGC-FN (以下, 由来不明 FN)」および「特定不能な異型腺細胞, AGC-NOS (以下, 由来不明 NOS)」に分類している。

精検は、判定報告書に検査方法を記載している。原則として、EC, FN や EC, NOS 例はコルポスコープ下組織診や頸管搔爬を行っている。EM, NOS 例には内膜細胞診を行い、疑陽性、陽性例では内膜組織診を行っている。由来不明 FN, 由来不明 NOS 例は、コルポスコープと内膜細胞診を勧めている。組織検体は、当協会に送付の上、病理医が診断を行っている。細胞診、組織診の結果を婦人科腫瘍専門医、細胞診専門医が総合的に判断し、経過観察や治療の方針を決定している。組織診で CIN3, 浸潤扁平上皮癌, AIS, 頸部腺癌や子宮内膜異型増殖症, 子宮内膜癌の病変が検出されれば要治療としている。それ以外の病変であれば 3~6 ヶ月ごとに細胞診や、適宜組織診を行って経過観察をしている。細胞診で、頸部細胞診 negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM) や内膜細胞診陰性が 2 回連続した場合は経過観察を終了し、次回検診を勧めている。2 回連続で異型細胞消失が確認されることなく、その後の受診を中断した場合は、追跡不能、不明例としている。

AGC 判定例について、年齢、経過中の最も grade の高かった病変の組織診結果、精検回数や経過観察期間を明ら

かにした。さらに、AGC 例の細分類の結果も調査した。由来を記載することの重要性を検討するために、EC, FN と EC, NOS を EC 群として、EM, NOS と組織診結果や観察期間を比較した。また、性状を記載することの重要性を明らかにすべく、FN 群 (EC, FN + 由来不明 FN) と NOS 群 (EC, NOS + EM, NOS + 由来不明 NOS) の組織診結果や観察期間を比較した。

AGC 例の細分類の精検で認められた病変の頻度や転帰の比較には χ^2 法を用いた。患者の年齢や、観察期間の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。細分類の要治療病変確定までの期間を Kaplan-Meier 法で比較し、Log-rank 法で検定をした。危険率 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

なお、検診に際して、受診者から検診結果や精検結果を精度向上目的で解析させていただく旨を、文書で同意を得ている。また、本検討は福島県保健衛生協会の倫理委員会の承認を得て行い、個人情報漏洩のないように留意して行った。

III. 結 果

2011 年から 2016 年の 6 年間で子宮頸がん検診の受診者は、延べ 444104 名で、要精検者は 4301 名、要精検率は 0.97% であった。細胞診異常の内訳は atypical squamous cells of undermined significance (ASC-US) が 916 例 (21.3%), atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H) が 555 例 (12.9%), low grade intraepithelial lesion (LSIL) が 1570 例 (36.5%), high grade intraepithelial lesion (HSIL) が 912 例 (21.2%), squamous cell carcinoma (SCC) が 52 例 (1.2%), AGC が 232 例 (5.4%), AIS が 17 例 (0.4%), Adenocarcinoma が 47 例 (1.1%) であった。

AGC 232 例は全例精検が実施され、精検未受診例はなかった。細分類は、AGC-EC が 111 例 (47.8%) で、その中で EC, FN とされた例は 20 例 (8.6%), EC, NOS の判定が 91 例 (39.2%) であった。EM, NOS が 103 例 (44.4%) であった。AGC の由来が判然とせず由来不明と判定した 18 例中 4 例 (1.7%) が由来不明 FN 判定で、由来不明 NOS が 14 例 (6.0%) であった。

Photo. 1 に、EC, FN の判定で、その後の組織診で AIS と診断された症例を示す。初回細胞診では、少数の腺系細胞の集塊に、核の腫大と重積を認めたが、羽毛状、ロゼット状配列を欠き、出血や壊死もみられなかった。頸部腺由来の異型細胞と認識できたが AIS と断定する所見に乏しく EC, FN と判定した。頸部精検および円錐切除で AIS を認めた。

Photo. 2 に EC, FN の判定で、組織診で浸潤扁平上皮癌で

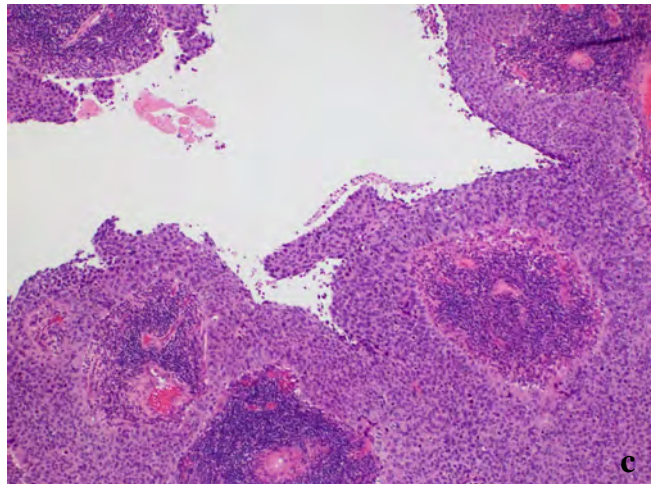
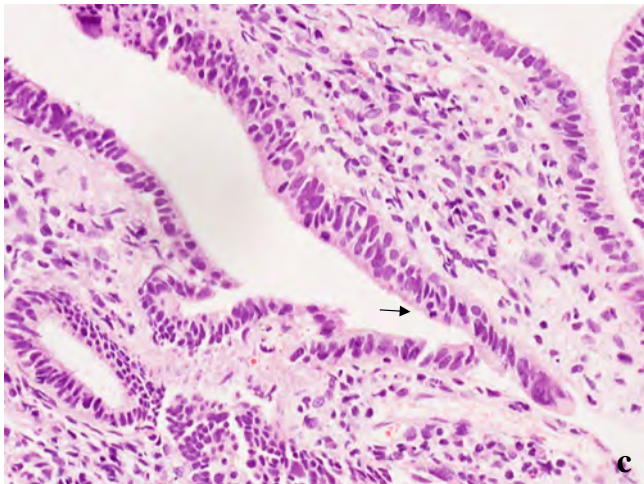
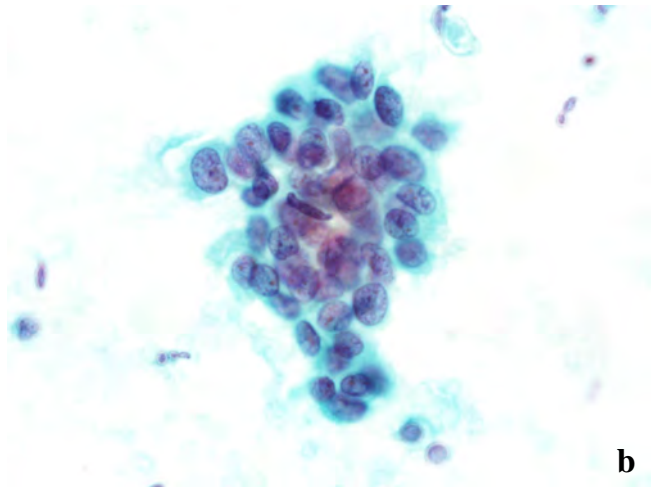
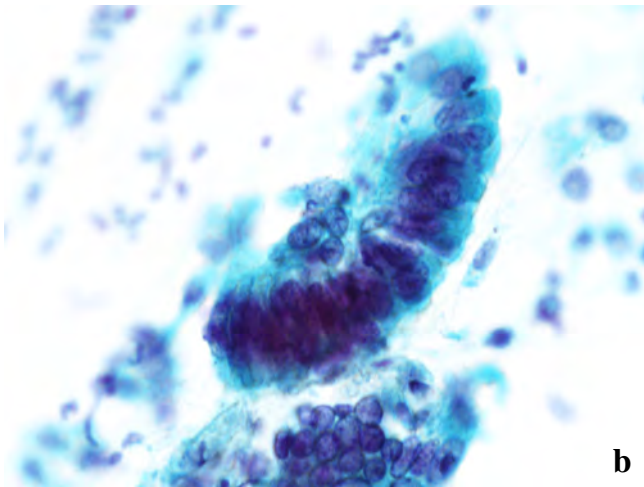
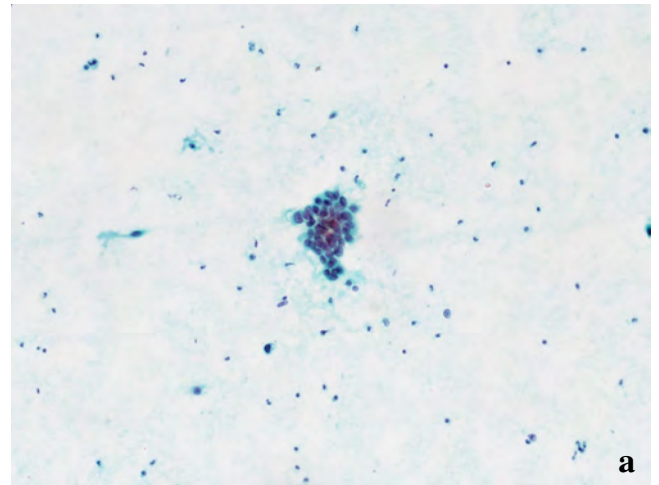
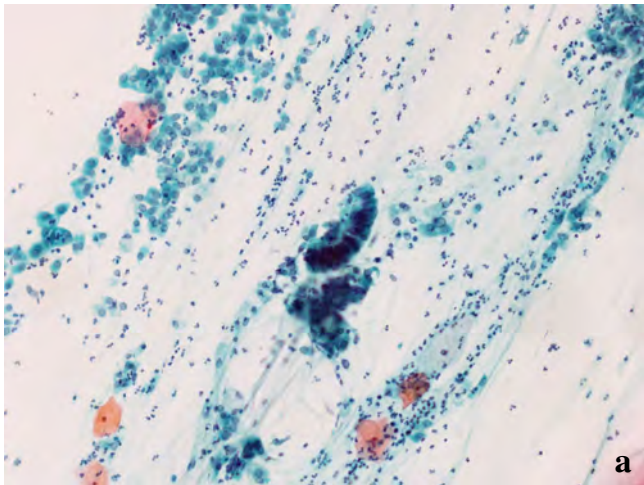


Photo. 1 a : Smear diagnosed as AGC-EC, FN revealing a few clusters of atypical glandular cells, without a hemorrhagic or necrotic background (conventional method, Pap. staining, $\times 10$). b : A cluster of columnar cells showing overlapping of hyperchromatic nuclei without feathering of the edges or prominent nucleoli (conventional method, Pap. staining, $\times 40$). c : Subsequent endocervical biopsy showed adenocarcinoma *in situ*. Endocervical glands lined by hyperchromatic cells with mitotic figures (arrow) (H&E staining, $\times 20$).

Photo. 2 a : Smear diagnosed as AGC-EC, FN showing small clusters of tightly coupled cells without solitary or scattered atypical cells (conventional method, Pap. staining, $\times 10$). b : A cluster of cuboidal cells showing overlapping of hyperchromatic nuclei and prominent nucleoli without dense cytoplasm. These findings led to confusion about the glandular origin of the squamous cells (conventional method, Pap. staining, $\times 40$). c : Surgical specimen revealing frank invasive squamous cell carcinoma. Carcinoma cells forming solid nests without glandular structures, invading the cervical stroma (H&E staining, $\times 10$).

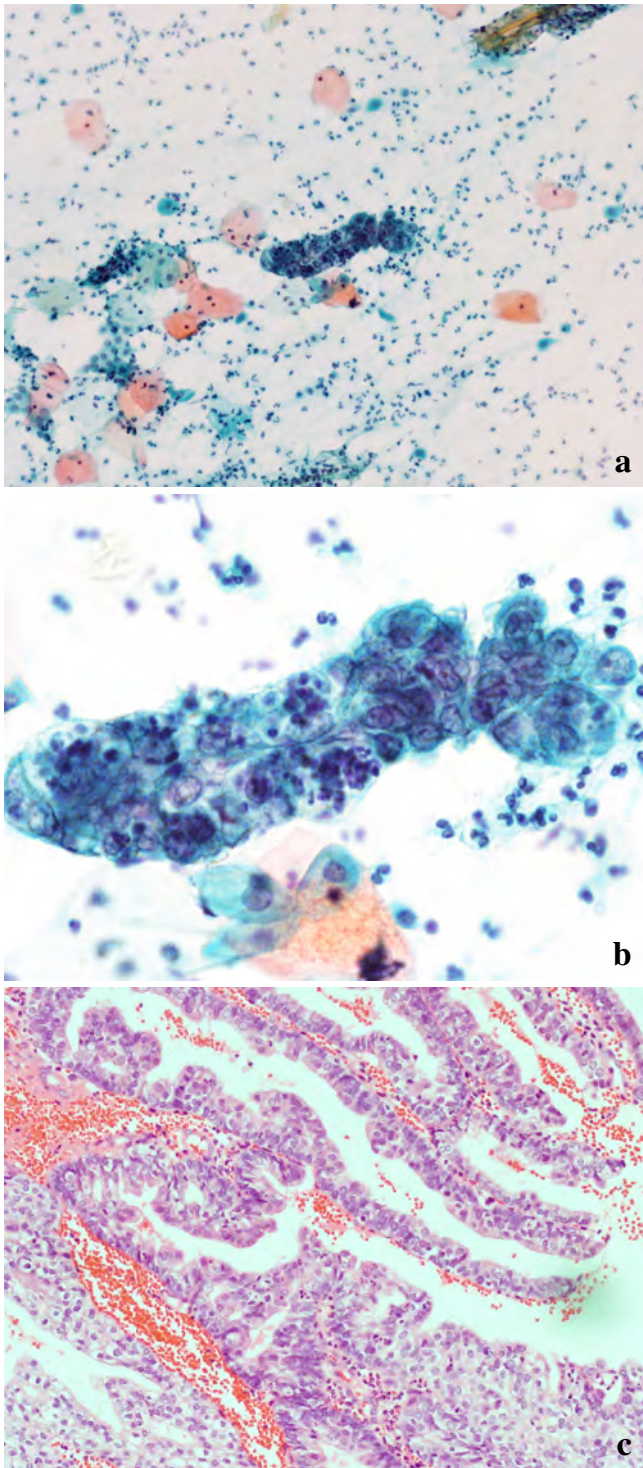


Photo. 3 a : Smear diagnosed as AGC-EM, NOS showing a few clusters of cuboidal cells with neutrophil infiltration (conventional method, Pap. staining, $\times 10$). b : A cluster of cuboidal cells showing large, irregular-shaped nuclei with coarse chromatin and cytoplasmic vacuoles (conventional method, Pap. staining, $\times 40$). c : Subsequent endometrial biopsy revealed endometrioid adenocarcinoma. Abnormal glands closely packed in a focally cribriform arrangement (H&E staining, $\times 20$).

Table 1 Proportions and ages of the patients classified into the five AGC subcategories

AGC category	No. of cases (%)	Mean age $\pm$ SD	p-value
AGC-total	232 (100%)	51.57 $\pm$ 11.55	—
AGC-EC	111 (47.8%)	50.62 $\pm$ 13.34	0.3376
AGC-EM, NOS	103 (44.4%)	52.33 $\pm$ 10.19	
AGC-unknown origin	18 (7.8%)	53.06 $\pm$ 6.89	
AGC-EC, FN	20 (8.6%)	47.30 $\pm$ 14.31	0.3980
AGC-EC, NOS	91 (39.2%)	51.39 $\pm$ 12.94	
AGC-EM, NOS	103 (44.4%)	52.33 $\pm$ 10.19	
AGC-FN, unknown origin	4 (1.7%)	52.29 $\pm$ 6.97	
AGC-NOS, unknown origin	14 (6.0%)	55.75 $\pm$ 6.80	

あった例を示す。濃染核を有する細胞が結合した小集塊状にみられた。核小体が明瞭で、細胞質は繊細で、扁平上皮系を示唆する厚い細胞質を欠いており、腺系の異型細胞と判断した。生検で扁平上皮癌であり、手術で T1b1 期の子宮頸部扁平上皮癌であった。

Photo. 3 に、EM, NOS 判定で、内膜組織診で類内膜腺癌と診断された例を示す。立方～低円柱状細胞の房状、柵状集塊がみられ、細胞質は空胞状で好中球の集簇を伴っていた。子宮内膜から落下した異型細胞と判断し EM, NOS と判定した。内膜細胞診で陽性となり、内膜組織診で類内膜腺癌と診断された。

Table 1 に AGC の細分類別の頻度と年齢を示す。AGC 全体の平均年齢は 51.6 歳であった。EC 群 (EC, FN+EC, NOS) の年齢は平均 50.6 歳であった。EM, NOS の年齢は平均 52.3 歳であった。両群の年齢構成に有意差はみられなかった ($p=0.338$)。EC, FN と EC, NOS の平均年齢は 47.3 歳と 51.4 歳であった。由来不明の平均年齢は 53.0 歳、由来不明 FN が 52.3 歳、由来不明 NOS が 55.8 歳であった。AGC の細分類群間で構成年齢に有意差はみられなかった ($p=0.398$)。

AGC 判定 232 例の精検、追跡結果を Table 2 に示す。58 例 25.0% に要治療病変がみられた。110 例 47.4% は異型細胞が消失し経過観察が終了している。21 例 9.1% が異型細胞持続で経過観察中、43 例 18.5% が経過中に未受診、追跡不能例となった。111 例の EC 群 (EC, FN+EC, NOS) では、21 例 18.9% に要治療病変が検出され、51 例 45.9% が観察終了となった。103 例の EM, NOS では、26 例 25.2% に要治療病変が検出され、54 例 52.4% は観察終了となった。EC 群と EM, NOS の由来別の比較では、両群に要治療病変検出率や異型細胞消失率に有意差はみられなかった ($p=0.264$ & 0.343)。EC 例の細分類では、EC, FN 20 例中 7 例 35.0% に要治療病変が検出され、EC, NOS 91 例中 14 例

Table 2 Results of follow-up study of patients classified into the five AGC subcategories

AGC category	No. of cases	Results of follow-up					
		Required treatment, No. (%)	p-value	Observation end, No. (%)	p-value	In follow-up, No. (%)	Lost, No. (%)
AGC-total	232	58 (25.0%)		110 (47.4%)		21 (9.1%)	43 (18.5%)
AGC-EC	111	21 (18.9%)	0.264	51 (45.9%)	0.343	15 (13.5%)	24 (21.6%)
AGC-EM, NOS	103	26 (25.2%)		54 (52.4%)		5 (4.9%)	18 (17.5%)
AGC-unknown origin	18	11 (61.1%)		5 (27.8%)		1 (5.6%)	1 (5.6%)
AGC-EC, FN	20	7 (35.0%)	0.042	8 (40.0%)	0.555	3 (15.0%)	2 (10.0%)
AGC-EC, NOS	91	14 (15.4%)		43 (47.3%)		12 (13.2%)	22 (24.2%)
AGC-FN, unknown origin	14	10 (71.4%)	0.093	2 (14.3%)	0.016	1 (7.1%)	1 (7.1%)
AGC-NOS, unknown origin	4	1 (25.0%)		3 (75.0%)		0 (0%)	0 (0%)

Table 3 Results of histological follow-up of patients classified into the five ACG subcategories

AGC category	No. of cases (%)	Benign or reactive lesions, No. (%)	Squamous lesions, No. (%)			Glandular lesions, No. (%)		Endometrial lesions, No. (%)		Extrauterine lesions, No. (%)
			CIN1/2	CIN3	Invasive squamous Ca.	AIS	Cervical adenoca.	Atypical endometrial hyperplasia	Endometrial carcinoma	Ovarian ca.
AGC-total	232	158 (68.1)	16 (6.9)	3 (1.6)	1 (0.4)	10 (4.3)	7 (3.0)	1 (0.4)	34 (14.7)	2 (0.9)
AGC-EC	111	74 (66.7)	16 (14.4)	3 (2.7)	1 (0.9)	10 (9.0)	7 (6.3)	0	0	0
AGC-EM, NOS	103	77 (74.6)	0	0	0	0	0	1 (0.9)	23 (22.3)	2 (1.9)
AGC-unknown origin	18	7 (38.9)	0	0	0	0	0	0	11 (61.1)	0
AGC-EC, FN	20	10 (50.0)	3 (15.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	3 (15.0)	0	0	0
AGC-EC, NOS	91	64 (70.3)	13 (14.3)	2 (2.2)	0	8 (8.8)	4 (4.4)	0	0	0
AGC-FN, unknown origin	14	4 (28.6)	0	0	0	0	0	0	10 (71.4)	0
AGC-NOS, unknown origin	4	3 (75.0)	0	0	0	0	0	0	1 (25.0)	0

15.4%と比較して有意に治療病変検出率が高かった ($p = 0.042$)。また、EC, FN では 8 例 40.0%, EC, NOS では 43 例 47.3% の異常細胞が消失し、両群に有意差はみられなかった ($p = 0.555$)。由来不明 18 例では、由来不明 FN 14 例中 10 例 71.4% に要治療病変を認め、由来不明 NOS 4 例中 1 例 25.0% に比して有意差はみられなかったが、要治療病変検出率が高い傾向がみられた ($p = 0.093$)。

組織学的検索および臨床的診断の詳細な結果を Table 3 に示す。EC 群 (EC, FN + EC, NOS) では、扁平上皮系異常として、CIN1/2 が 16 例、CIN3 が 3 例、浸潤扁平上皮癌が 1 例確認された。AIS が 10 例に、浸潤性頸部腺癌が 7 例

に確認された。内膜や子宮外病変は認められなかった。一方、EM, NOS では子宮内膜異型増殖症が 1 例、子宮内膜癌が 23 例、卵巣癌が 2 例に確認されている。由来不明からは子宮内膜癌が 11 例確認された。EM や由来不明からの要治療病変は内膜や子宮外病変由来で、頸部病変はみられなかった。

Fig. 1 に、EC と EM の由来別の、要治療病変検出までの観察期間と累積要治療病変検出率を示す。NOS と FN を併せた頸管腺由来の EC 群の要治療病変検出までの期間が 6.43 ± 7.21 月、内膜由来の EM, NOS では 4.53 ± 5.71 月であった。EM, NOS は EC 群 (EC, FN + EC, NOS) に比して病変検出までの期間が有意に短かった ($p = 0.0319$)。EC,

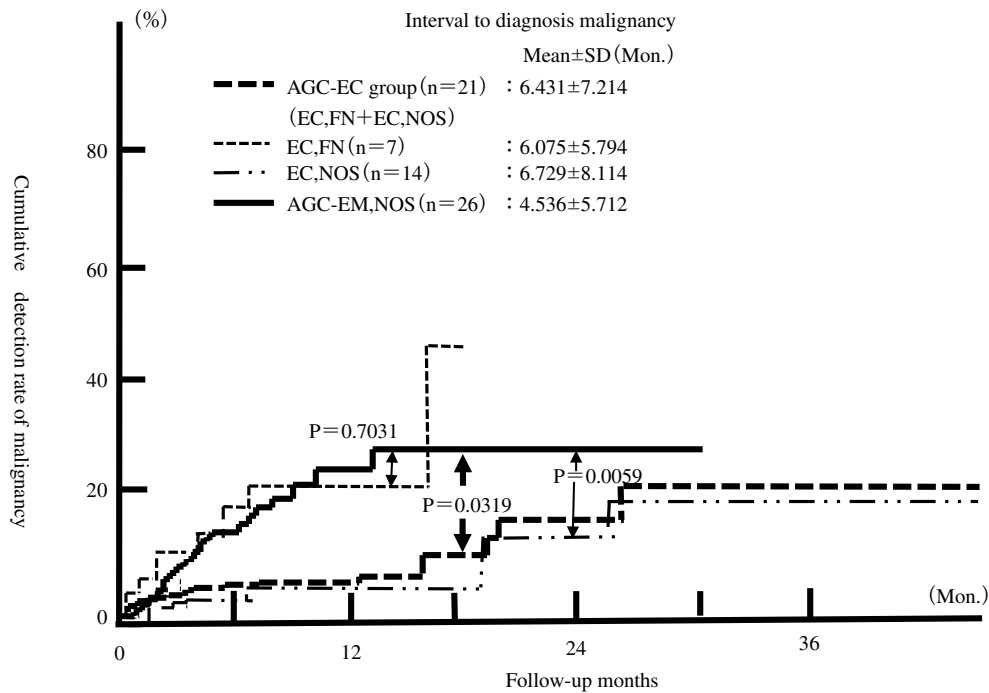


Fig. 1 Interval to diagnosis of malignancy in the AGC-EC and AGC-EM categories

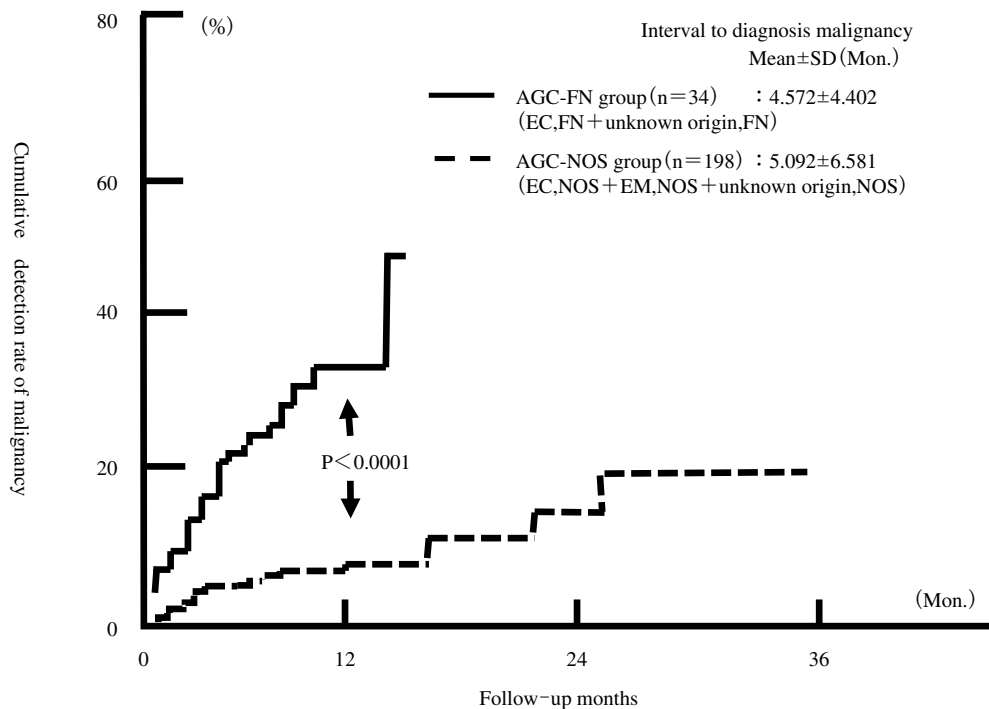


Fig. 2 Interval to diagnosis of malignancy in the AGC-FN and AGC-NOS categories

NOS では検出までの期間が 6.73 ± 8.11 月で、EM, NOS より有意に長かった ($p=0.0059$)。EC, FN では検出までの期間は 6.08 ± 5.79 月で、EM, NOS と有意差はみられなかった ($p=0.7031$)。

Fig. 2 に、FN と NOS の性状判定別の比較を示した。EC,

FN と由来不明 FN を併せた FN 群と、EC, NOS と EM, NOS, 由来不明 NOS を併せた NOS 群の、要治療病変検出までの観察期間と累積要治療病変検出率を算出した。FN 群 (EC, FN+由来不明 FN) の要治療病変検出までの期間が 4.57 ± 4.40 月に対して、NOS 群 (EC, NOS+EM, NOS+

由来不明 NOS) では 5.09 ± 6.58 月であった。FN 群は NOS 群に比して病変検出までの期間が有意に短かった ($p < 0.0001$)。

IV. 考 察

AGC 判定は、反応性、修復性変化を超えた異型腺細胞を認めるが、AIS や浸潤性腺癌とする所見がないものに用いられる¹⁾。頸部細胞診の 0.1~2% にみられると報告されている^{8~11)}。Kanber ら¹⁰⁾は検診で 0.13% に、Pardhan ら¹¹⁾は 0.6% が、Boyraz ら⁵⁾は 0.09% が AGC であったと報告している。今回、われわれの検討では、頸部細胞診 444104 例中 AGC 判定は 232 例と 0.05% であった。細胞診異常例 4301 例の 5.4% を占めていた。他の報告より頻度がやや低いが、対象が集団検診であり、既往で頸部細胞診異常なしの繰り返し受診者が多いことを考慮すると、AGC の頻度としては妥当と考えられる。

AGC から上皮内浸潤性病変が 20~50% 検出されるとの報告がある^{3~7)}。Zhao ら³⁾は 22.5%、Kim ら⁴⁾は 28.9%、Boyraz ら⁵⁾は 33.8%、Krane ら⁶⁾は 34.3%、Mood ら⁷⁾は 50% に、悪性や前癌病変を認めたと報告している。今回の検討でも AGC 232 例から 58 例、25.0% に CIN3、扁平上皮癌、頸部腺癌、内膜癌など要治療病変を認め、他の報告と同様であった。

AGC は、由来する細胞によって臨床的意義や患者に対する管理法が異なるため、できるかぎり内頸部か子宮内膜か由来を区別するように求められている¹⁾。

AGC-EC より AGC-EM は年齢が高いことが多く、子宮内膜癌の危険因子として高齢者の AGC を提唱している報告がみられる^{5,12)}。今回の検討では、EC 群と EM, NOS に年齢差はみられなかった。

EC, FN および EC, NOS からは CIN3、浸潤性扁平上皮癌や AIS、浸潤性頸部腺癌が 18.9% に検出された。一方、AGC-EM からは子宮内膜異型増殖症、子宮体癌が 23.3% に、また卵巣癌が子宮内に落下した症例を 1.9% に検出できた。Boyraz ら⁵⁾は、AGC-EC では 18 例中 2 例に CIN2/3 を、内膜癌 1 例を検出、AGC-EM では 14 例中 2 例に内膜癌を認めたと報告している。Pardhan ら¹¹⁾は AGC-EC 760 例から CIN2/3 が 21 例 2.8%、AIS が 12 例 1.6%、頸部腺癌 3 例 0.4%、内膜異型増殖症 4 例 0.5%、内膜癌 3 例 0.4% を検出、AGC-EM 211 例からは、AIS 1 例 0.5%、内膜異型増殖症 16 例 7.6%、内膜癌 47 例 22.3% を検出したと報告している。われわれも、EC 群 (EC, FN + EC, NOS) 111 例からは CIN3、AIS、頸部腺癌などの頸部病変を 21 例 18.9% 検出した。EM, NOS 103 例からは 24 例 23.3% の内膜病変

と 2 例 1.9% の卵巣癌を検出している。このように、AGC-EC では、頸部病変由来、AGC-EM では内膜や子宮外病変由来の悪性、前癌病変由来であることが多く、異型腺細胞を認めた際には、その由来を推測することが重要である。EC, NOS や EC, FN ではコルポスコープ下頸部組織診や頸管搔爬を、EM, NOS では内膜細胞診を行うように指針を示すことで、その後の適切な臨床的アプローチにつながると思われる。

さらには、EC 群 (EC, FN + EC, NOS) と EM, NOS の要治療病変検出までの観察期間は、EC 群が EM, NOS に比して有意に長かった。EM, NOS では、内膜細胞診、内膜組織診という方法で、要治療内膜病変がすみやかに検出されていることにより検出までの期間が短いと考えられる。一方、EC 群では、頸部腺癌はコルポスコープで病変部が不可視の場合や、扁平上皮病変に比して明確なコルポスコープ所見を欠くことも多く、診断確定まで数回の精検を要することも多いことが、検出まで長期間を要する要因と考えられる。特に、EC, NOS で有意に長期化していたが、NOS としか判定できない範疇の細胞所見を呈する例では、頸部病変の範囲が狭小であることや、頸管の子宮側深い部分に病変が存在しており腫瘍細胞が十分に採取できていないなどの要因で、細胞診で腫瘍性病変として把握できず、EC, NOS 判定となっている症例が存在すると考えられる。このような例では、精検でもコルポスコープで病変が容易に確認できないことが観察期間の長期化につながっていると予想される。AGC 例、特に EC 群では一回の組織診で病変が検出されなくても、十分な経過観察や繰り返しコルポスコープ下組織診や頸管搔爬などの精検を行っていくことが肝要である。

EC, FN は EC, NOS に比して要治療病変検出率は高かったが、経過観察で異常細胞が消失した例の割合に差はみられなかった。これは AGC という範疇での細胞所見は、AIS や Adenocarcinoma 例とは異なり、腫瘍以外にも炎症や化生などの多彩な変化を、一定の割合で含まざるを得ないことによる。そのような症例では、反応性変化が改善、消退し異型細胞が消失すると考えられる。その割合が AGC という範疇では EC, FN でも EC, NOS でもほぼ同等に含まれており除外できないことから、異型細胞消失率には差が生じなかったと考えられる。

また、EC, NOS と EM, NOS と由来不明 NOS を併せた NOS 群に比して、EC, FN と由来不明 FN を併せた FN 群は病変検出までの期間が有意に短かった。本論文と同じように AGC-FN が他のカテゴリーに比して腫瘍の検出率が高かったとする報告がみられる^{5,11,13,14)}。NOS や FN を付記することで、特に FN の場合は高リスク群であることが臨床

側に重要な情報であると考えられる。ただし今回の検討では、由来不明 FN からの要治療病変は、すべて子宮内膜癌であった。このような症例は、その腫瘍性性状を重視して FN と判定され、FN 群からの高い要治療病変発見率になったと考えられる。このような症例について、前述のように由来を重視して EM, NOS とするのか、重篤性を重視して由来不明 FN とするかは検者間で解釈に差異があったと考えられる。今後は、検者間で判定基準の統一化を図り、臨床側に AGC 症例が適切に管理されるように伝えることが課題と考えられる。

AGC 判定例では、患者の適切な管理、要治療病変を効果的かつすみやかに同定するために、その由来や性状を明記することが重要である。EC または EM と記載することで、精検で行う検査が明らかとなる。EC 例では、初回精検で病変が検出されなくても、繰り返し観察や検査を行う必要がある。また、NOS や FN と性状を記載することで、要治療病変のリスクを臨床側に伝えることができる。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Objective : To determine the clinical significance of atypical glandular cells (AGC), we evaluated the results of histologic examination in patients who showed AGC on cytology screening for uterine cancer.

Study Design : A retrospective study was conducted of cases with AGC detected on conventional Pap smears between April 2011 and March 2016. The results revealed correlations between the histologic diagnoses and cytologic diagnoses when the AGC-positive cases were divided into the following 5 subcategories : AGC of endocervical origin, favor neoplasm (EC, FN) ; AGC of endocervical origin, not otherwise specified (EC, NOS) ; AGC of endometrial origin, NOS (EM, NOS) ; AGC-FN ; AGC-NOS.

Results : Of the 232 patients with AGC, 58 cases (25.0%) were detected to have precancerous and malignant lesions. Among the 111 patients with EC, FN or EC, NOS, there were 3 patients with CIN3, 1 with invasive squamous cell carcinoma, 10 with AIS and 7 with invasive cervical adenocarcinoma. Among the 103 patients with EM, NOS, 1 patient had atypical endometrial hyperplasia, 23 had endometrial carcinoma and 2 had ovarian carcinoma. Among the 34 patients with EC, FN and AGC-FN, 17 had precancerous or malignant lesions.

Conclusion : Detection of AGC could be predictive of precancerous or malignant lesions. AGC subcategorization is important for adequate management of the patients. Patients with EC should be followed up with endocervical sampling, and patients with EM should be followed up with endometrial sampling.

文 献

- 1) Solomon, D., Davey, D. D., Kurman, R. J., Moriarty, A., O'Connor, D., Pretz, M., et al. The 2001 Bethesda system : terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 2002 ; 287 : 2114-2119.
- 2) Schorge, J. O., Ray-Hain, J. A. Atypical glandular cells. Clin Obstet Gynecol 2013 ; 56 : 35-43.
- 3) Zhao, C., Austin, R. M., Pan, J., Barr, N., Martin, S. E., Raza, A., et al. Clinical significance of atypical glandular cells in conventional pap smears in large, high-risk U. S. west coast minority population. Acta Cytol 2009 ; 53 : 153-159.
- 4) Kim, S. S., Suh, D. S., Kim, K. H., Yoon, M. S., Choi, K. U. Clinicopathological significance of atypical glandular cells on Pap smears. Obstet Gynecol Sci 2013 ; 56 : 76-83.
- 5) Boyraz, G., Basaran, D., Salman, M. C., Ibrahimov, A., Onder, S., Akman, O., et al. Histological follow-up in patients with atypical glandular cells in Pap smears. J Cytol 2017 ; 34 : 203-207.
- 6) Krane, J. F., Lee, K. R., Sun, D., Yuan, L., Crum, C. P. Atypical glandular cells of undetermined significance. Outcome predictions based on human papillomavirus testing. Am J Clin Pathol 2004 ; 121 : 87-92.
- 7) Mood, N. I., Eftekhari, Z., Haratian, A., Saeedi, L., Moghaddam, P. R., Yarandi, F. A. A cytohistologic study of atypical glandular cells detected in cervical smears during cervical screening tests in Iran. Int J Gynecol Cancer 2006 ; 16 : 153-159.
- 8) Marques, J. P., Costa, L. B., Pinto, A. P., Lima, A. F., Duarte, M. E., Barbosa, A. P., et al. Atypical glandular cells and cervical cancer : Systematic review. Rev Assoc Med Bras 2011 ; 57 : 234-238.
- 9) Chummun, K., Fitzpatrick, M., Lenehan, P., Mooney, E., Flannelly, G. Diagnostic and therapeutic dilemma associated with atypical glandular cells on liquid-based cervical cytology. Cytopathol 2012 ; 23 : 378-382.
- 10) Kanber, Y., Charbonneau, M., Auger, M. Pap smears with glandular cell abnormalities. Are they detected by rapid prescreening? Cancer Cytopathol 2015 ; 123 : 739-744.
- 11) Pardhan, D., Li, Z., Ocque, R., Patadji, S., Zhao, C. Clinical significance of atypical glandular cells in Pap tests : An analysis of more than 3000 cases at a large academic women's center. Cancer Cytopathol 2016 ; 124 : 589-595.
- 12) Sharpless, K. E., Schnatz, P. F., Mandavilli, S., Greene, J. F., Sorosky, J. I. Dysplasia associated with atypical glandular cells on cervical cytology. Obstet Gynecol 2005 ; 105 : 494-500.
- 13) Tam, K. F., Cheung, A. N., Liu, K. L., Ng, T. Y., Pun, T. C., Chan, Y. M., et al. A retrospective review on atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS) using the Bethesda 2001 classification. Gynecol Oncol 2003 ; 91 : 603-607.
- 14) Swangsang, P., Sa-Teng, C., Suprasert, P., Srisomboon, J., Khunamornpong, S., Kietpeerakool, C. Clinical significance of atypical glandular cells on Pap smears. Experience from a region with a high incidence of cervical cancer. J Obstet Gynecol Res 2011 ; 37 : 496-500.

液状化検体細胞診を用いたセルブロック法の 核酸品質の解析と保管への影響

安倍 秀幸¹⁾ 河原 明彦¹⁾ 貞嶋 栄司²⁾ 田中 良太³⁾
村田 和也¹⁾ 高瀬頼妃呼¹⁾ 牧野 諒央¹⁾ 吉田 友子¹⁾
福満 千容¹⁾ 篠田由佳子¹⁾ 内藤 嘉紀¹⁾ 秋葉 純¹⁾

久留米大学病院病理診断科・病理部¹⁾, 地方独立行政法人佐賀県医療センター好生館ライフサイエンス研究所²⁾,
杏林大学医学部呼吸器・甲状腺外科学教室³⁾

目的：液状化検体細胞診（LBC）を用いたセルブロック（CB）法における核酸品質を解析するとともに LBC-CB の保管における核酸品質の影響についても調査した。

方法：2020 年 1 月から 3 月までの期間で、体腔液細胞診で肺癌および卵巣癌と悪性診断された 19 例を対象に LBC-CB の核酸品質を解析した。また、2016 年から 2019 年の期間で LBC-CB 保管における核酸品質の影響について調査した。

成績：LBC 検体から作製した CB 標本の細胞形態は良好であり、LBC-CB 切片表面の面積は DNA 量に関連性を認めた ($r=0.808$)。また、対象期間の検体において、DNA integrity number (DIN) 値が解析可能であった症例は 16 例 (84.2%) みられ、DNA の品質は比較的よく保たれていた。これらの症例において検体受取後から LBC-CB 作製までの検体保存日数と DIN 値に明らかな関連性はみられなかったが ($r=-0.176$)、LBC-CB は長期保管により DNA の品質低下を及ぼすことが明らかとなった ($p<0.001$)。

結論：LBC-CB の核酸品質は良好であるため、十分な DNA 量の確保によりさまざまな遺伝子検査への応用が期待できると考える。

Key words : Cell block, Liquid-based cytology, Sodium alginate, DNA quality

I. はじめに

Nucleic acid quality in sodium alginate cell blocks prepared from liquid-based cytology specimens

Hideyuki ABE¹⁾ C. T., C. M. I. A. C., Akihiko KAWAHARA¹⁾ C. T., C. F. I. A. C., Eiji SADASHIMA²⁾ C. T., Ryota TANAKA³⁾ M. D., Kazuya MURATA¹⁾ C. T., I. A. C., Yorihiro TAKASE¹⁾ C. T., I. A. C., Ryo MAKINO¹⁾ C. T., J. S. C., Tomoko YOSHIDA¹⁾ C. T., I. A. C., Chihiro FUKUMITSU¹⁾ C. T., I. A. C., Yukako SHINODA¹⁾ C. T., J. S. C., Yoshiaki NAITO¹⁾ M. D., Jun AKIBA¹⁾ M. D.

¹⁾Department of Diagnostic Pathology, Kurume University Hospital

²⁾Life Science Research Institute, Saga-ken Medical Center Koseikan

³⁾Department of Surgery, Kyorin University School of Medicine

論文別刷請求先 〒 830-0011 福岡県久留米市旭町 67 久留米大学
病院病理診断科・病理部 安倍秀幸

令和 2 年 7 月 28 日受付

令和 2 年 8 月 11 日受理

ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded : FFPE) セルブロック (cell block : CB) においては、遠心分離細胞収集法や細胞凝固・固化法などさまざまな作製法が知られている^{1~4)}。現在、婦人科および非婦人科における液状化検体細胞診 (liquid-based cytology : LBC) の普及により、細胞診検体を用いた遺伝子解析への応用が試みられている⁵⁾。また、この LBC 検体からセルブロック (LBC-CB) を作製する試みもなされており、その利点や作製法に関して報告がある^{6~8)}。CB の利点は、免疫細胞化学、fluorescence *in situ* hybridization (FISH)、遺伝子変異検査のような分子病理学的検査に応用できるのみで

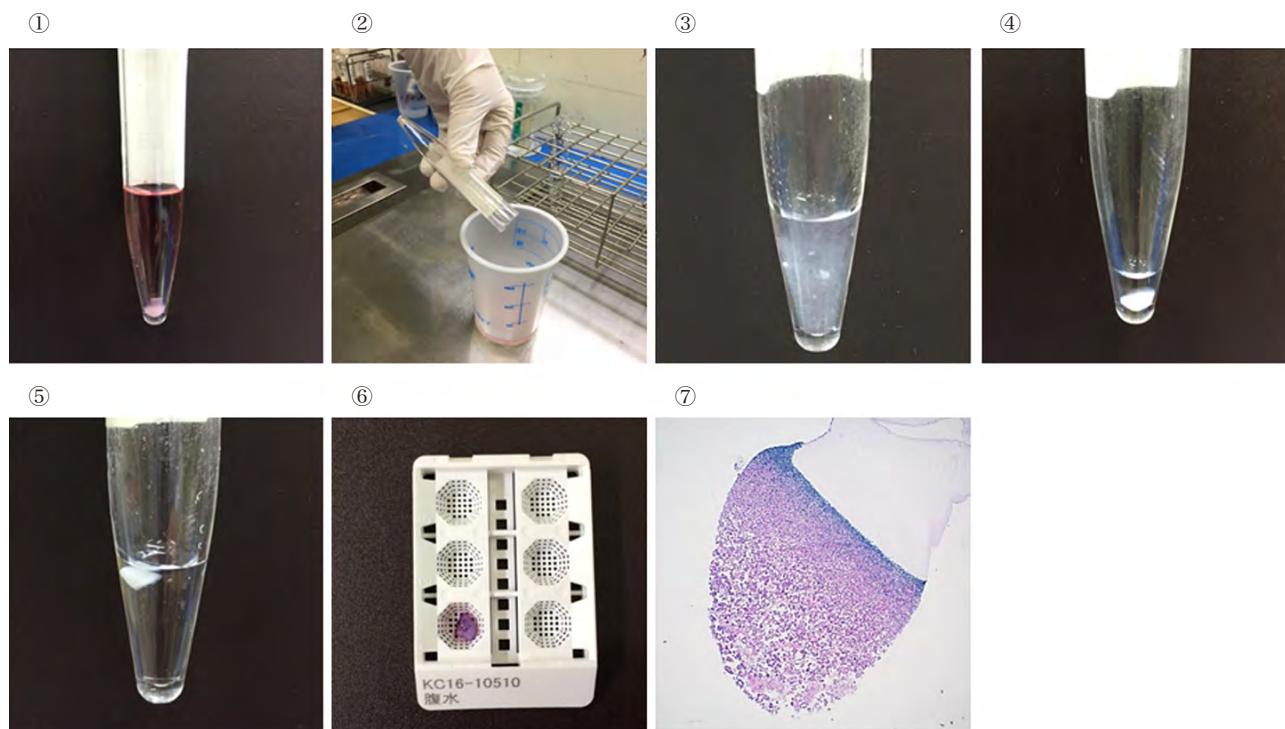


Photo. 1 Cell block preparation method using sodium alginate.

- ① Fix in CytoRich Red overnight at room temperature
- ② Decant supernatant after centrifuging at 3000 rpm for 3 minutes
- ③ Add 2 or 3 drops of 1% sodium alginate
- ④ Add 1~2 ml of 1 M calcium chloride solution after centrifuging at 3000 rpm for 5 minutes
- ⑤ Wash with distilled water
- ⑥ Solidified sediment in cassette
- ⑦ H & E staining

なく⁹⁾、パラフィンブロックとして保管することも可能なことである。

次世代シーケンサー (next generation sequencer : NGS) は、多数の遺伝子の塩基配列を高速で解読できる装置であり、近年、がんなどの病気やその他の生物学的現象に関連するさまざまな要因を研究するために多くの分野で活発に使用されるようになってきた¹⁰⁾。NGSを用いた遺伝子解析は、FFPE 組織検体のみならず、細胞診検体も検体になりうる^{11,12)}。そのため、細胞診検体における核酸品質を含めた精度管理は重要である。しかしながら、LBC-CB 検体に関する核酸品質の報告は少なく、運用上の留意点や問題点は明らかにされていない。

今回われわれは、LBC-CB 法における核酸品質の解析と CB 検体の保管期間における核酸品質の影響について検討したので報告する。

II. 対象および方法

LBC-CB の核酸品質検証には、2020 年 1 月から 3 月まで

の期間で、体腔液細胞診で肺癌および卵巣癌と悪性診断され、その後、検体保管のため日常業務で LBC-CB が作成された 19 例 (男性 6 例, 女性 13 例, 平均年齢 68.9 歳) を対象とした。LBC-CB は、体腔液検体をサイトリッチレッド保存液 (日本ベクトンデッキンソン株式会社) で少なくとも 1 晩室温固定後、BD サイトリッチTM 標本作製手順に従い LBC 標本作製し、診断終了後に残検体をアルギン酸ナトリウム法で固め (Photo. 1), LBC-CB を作製した¹⁾。なお、LBC 処理後の残検体は LBC-CB 作製まで 4℃ で冷蔵保存した。対象症例において、LBC-CB の二次元的な切片表面の面積 (CB 沈渣塊をメジャーで計測) と、有核腫瘍細胞の割合 (2 名で判定した平均値を使用) のどちらが DNA 量に関係を示すか否かを調査した。同様に、LBC-CB 作製までの検体保存日数と DNA の品質を示す DNA integrity number (DIN) 値の関係を比較した。また、Cobas EGFR 遺伝子検査 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) ですぐに変異が明らかとなっている 2 例 (サンプル症例 No. 1 と症例 No. 18) の LBC-CB を 4 μm に薄切した 20 枚の切片を用いて、オンコマインTM Dx Target Test マルチ CDx シス

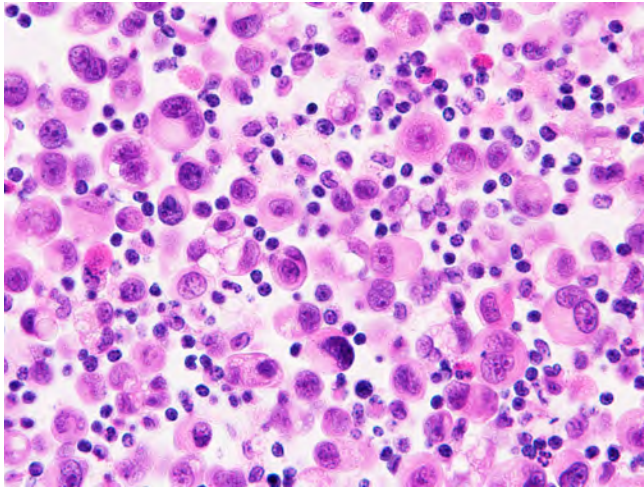


Photo. 2 Representative high-power images of hematoxylin and eosin-stained sections of lung cancer prepared by the liquid-based cytology (LBC) cell block (CB) method. (Original magnification : $\times 400$).

テムのパネル検査を施行した。

LBC-CB の保管における核酸品質の影響を検証するために、2016 年から 2019 年の期間において、各年の 1 月から 3 月の間に作製されていた肺癌の体腔液細胞診 LBC-CB 例を無作為に 5 例ずつ抽出した。合計 20 例の LBC-CB 検体を用いて DIN 値を解析し、LBC-CB 保管における核酸品質の影響を調査した。なお、これらの保管された CB の作製方法もアルギン酸ナトリウム法を実施し、CB の保管には高温多湿を避けた冷暗所資料室を用いた。

アルギン酸ナトリウム法によるセルブロック作製方法

アルギン酸ナトリウム法を用いたセルブロック作製とその写真 (Photo. 1) を示す。

- ①LBC 保存液 (サイトリッチレッド) で少なくとも 1 晩固定した検体を使用する。
- ②プラスチックピット (日水製薬, アクリル樹脂製) 容器を、3000 rpm (1670 G) 3 分間遠心後、上澄み固定液を除去する (ホルマリン再固定は行わない)。
- ③固定液を除去後、プラスチックピットに 1% アルギン酸ナトリウム液 (富士フイルム和光純薬株式会社, 粘度 80~120cp, Lot : LAJ6243) を数滴入れ、沈渣をよく混和する。
- ④混和後、プラスチックピットを 3000 rpm (1670 G) 5 分間遠心する。プラスチックピットに 1 M 塩化カルシウム液を 1~2 ml 入れ、数分間放置する。
- ⑤その後、プラスチックピットに蒸留水を入れ、沈渣を浮遊させるとともに固化した沈渣を洗浄する。
- ⑥固化した沈渣は、通常の脱水包埋工程を経て、パラフィン包埋ブロックを作製する。

⑦パラフィン包埋ブロック後、HE 染色を施行する。

核酸抽出法と評価法

LBC-CB から $6\mu\text{m}$ の薄切切片標本 10 枚を作製し、コバース® DNA プレパレーションキット (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて DNA を抽出した。DNA の抽出方法に関しては、使用するキットのプロトコールに従い実施し、スピニングカラムへの DNA 精製は、自動核酸抽出装置 QIAcube (株式会社キアゲン) を使用した。抽出された DNA は NanoDrop One (サーモフィッシュサイエントフィック株式会社) で DNA 濃度を測定した。DNA の品質解析は、全自動電気泳動システム TapeStation® (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いて DIN 値を測定した。なお、全自動電気泳動システム TapeStation® の解析には、最低 $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ 以上の DNA 量が必要であるため、本検討では DNA 量が少なくとも $15\text{ ng}/\mu\text{l}$ 以上抽出できた症例にかぎり、全自動電気泳動システムで DIN 値を解析した。DIN 値はゲノム DNA の分解度に応じて 1~10 (低品質~高品質) にスコア化された値である。

統計学的解析

LBC-CB 切片表面の面積、有核腫瘍細胞の割合と DNA 量および検体保存日数と DIN 値の関連性は、Spearman の順位相関係数 (r) を用いて評価した。LBC-CB 保管における核酸への影響は、Jonckheere-Terpstra trend test を用いて保存期間と DIN 値の関連性を評価した。なお、統計ソフトウェアは SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, United States) を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

本研究は当院倫理委員会の承認を受けて実施した (研究番号 20035)。

III. 結 果

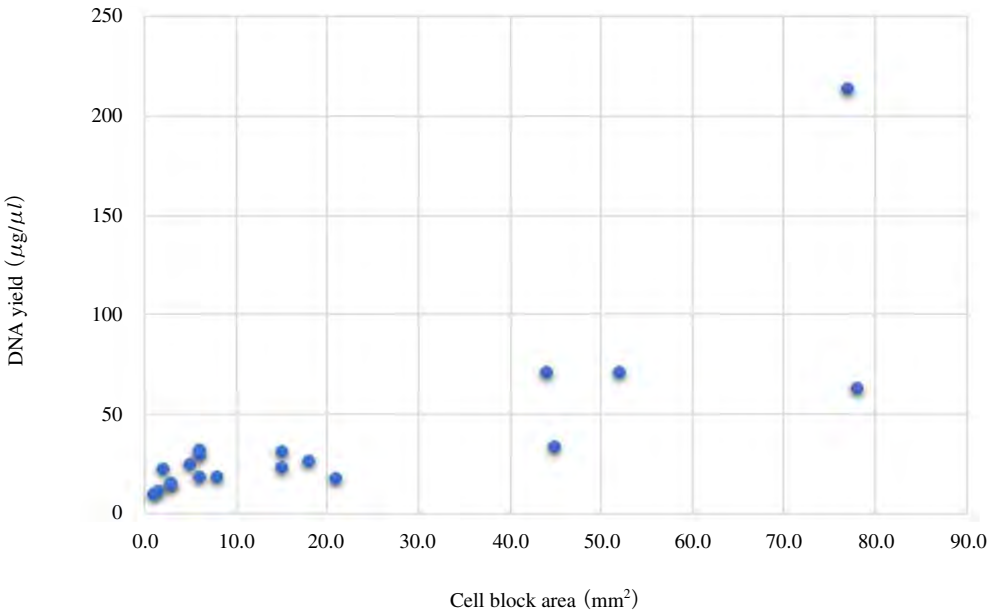
1. 液状化検体細胞診を用いたセルブロック法の核酸品質

LBC-CB の HE 染色における核クロマチンや細胞質の染色性は良好で、細胞形態の観察は可能であった (Photo. 2)。Table 1 にサイトリッチレッド保存液を用いて作製された 19 例の LBC-CB の切片表面の面積、有核腫瘍細胞の割合、DNA 量と DIN 値の結果を示し、Fig. 1 に LBC-CB 切片表面の面積と DNA 量の関係を示す。LBC-CB 切片表面の面積と DNA 量の関係において、症例 No. 3 が最大 77.0 mm^2 、 $213.5\text{ ng}/\mu\text{l}$ の DNA 量であったのに対し、症例 No. 12 が最小 1.0 mm^2 、 $9.6\text{ ng}/\mu\text{l}$ の DNA 量であった。同様に LBC-CB 切片表面の面積が 25 mm^2 以上を示した症例は 26.3% (5/19) であったのに対し、 5 mm^2 以下を示した症例は 31.6% (6/19)

Table 1 Results of evaluation of the DNA quantity and DNA integrity number in cell blocks prepared from liquid-based cytology samples

No.	Diagnosis	Age	Sex	Storage time (days)	Cell block area mm ²	Percent of tumor nuclei	DNA yield (ng/ μ l)	DIN
1	LK	53	F	1	6.0 (3.0 $\times$ 2.0)	15%	31.7	6.5
2	LK	73	F	2	45.0 (9.0 $\times$ 5.0)	80%	33.3	7.1
3	LK	72	M	2	77.0 (11.0 $\times$ 7.0)	8%	213.5	6.3
4	OC	85	F	2	44.0 (11.0 $\times$ 4.0)	90%	70.7	5.6
5	LK	85	F	3	52.0 (13.0 $\times$ 4.0)	85%	71.0	5.9
6	OC	66	F	4	78.0 (13.0 $\times$ 6.0)	80%	63.2	4.6
7	OC	45	F	6	18.0 (6.0 $\times$ 3.0)	35%	26.7	5.0
8	LK	67	M	6	3.0 (3.0 $\times$ 1.0)	50%	15.5	4.2
9	LK	75	F	7	15.0 (5.0 $\times$ 3.0)	60%	31.1	6.6
10	LK	72	M	7	6.0 (3.0 $\times$ 2.0)	15%	29.9	5.9
11	LK	59	F	7	3.0 (2.0 $\times$ 1.5)	8%	14.4	ND
12	LK	69	F	7	1.0 (1.0 $\times$ 1.0)	65%	9.6	ND
13	LK	68	M	8	21.0 (7.0 $\times$ 3.0)	65%	17.9	6.7
14	LK	56	M	8	2.0 (2.0 $\times$ 1.0)	8%	22.6	3.6
15	LK	70	M	8	1.5 (1.5 $\times$ 1.0)	40%	11.5	ND
16	LK	85	F	9	8.0 (4.0 $\times$ 2.0)	90%	18.4	4.3
17	LK	75	F	11	5.0 (2.0 $\times$ 2.5)	45%	24.7	6.3
18	LK	76	F	15	6.0 (3.0 $\times$ 2.0)	70%	18.2	3.6
19	LK	59	F	16	15.0 (5.0 $\times$ 3.0)	8%	23.3	6.9

Storage time (days) : Storage time (days) refers to the period from sample receipt to cell block preparation, DIN : DNA integrity number, ND : not done, LK : lung cancer, OC : ovarian cancer



($r=0.808$, $p<0.001$)

Fig. 1 A significant correlation was observed between the DNA yield and the cell block area ($r=0.808$, $p<0.001$).

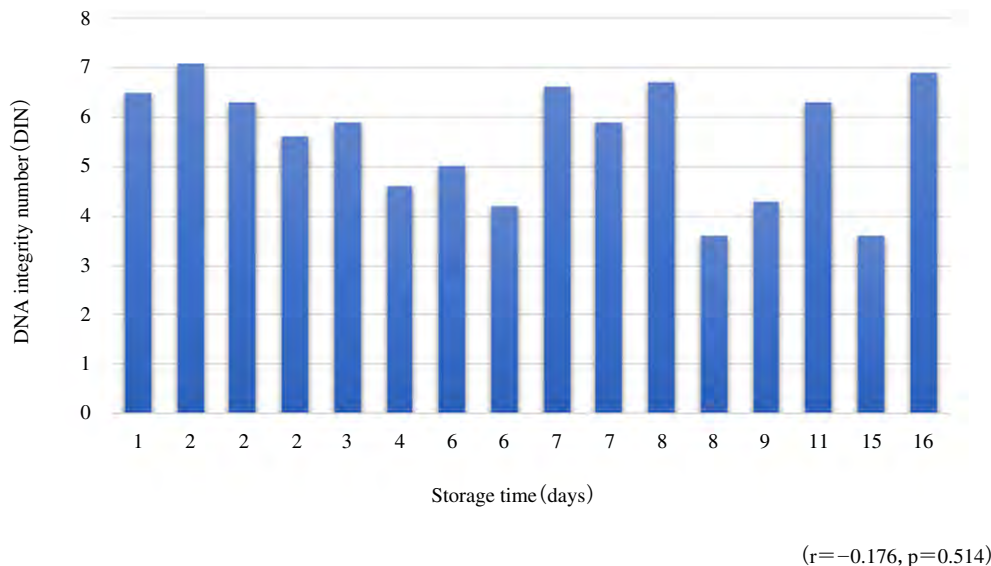


Fig. 2 Comparison of the DNA integrity number (DIN) and storage time (days) in liquid-based cytology cell blocks prepared from CytoRich Red samples.

であった。LBC-CB 切片表面の平均面積は 21.4 mm^2 で、DNA 量が $39.3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ を示し、LBC-CB 切片表面の面積は DNA 量に正の相関 ($r=0.808$, $p<0.001$) を示した。

有核腫瘍細胞の割合と DNA 量の関係において、症例 No. 4 と症例 No. 16 が最大割合 90.0% であったのに対し、それぞれの DNA 量は $70.7 \text{ ng}/\mu\text{l}$ と $18.4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった。有核腫瘍細胞の割合は症例によりさまざまであり（平均有核腫瘍細胞の割合：48.3%，最大 90.0%～最小 8.0%），LBC-CB 有核腫瘍細胞の割合は DNA 量に関連性を示さなかった ($r=0.169$, $p=0.488$)。

核酸品質に関して、LBC-CB から抽出した DNA 量が $15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 以上で DIN 値が解析可能であった症例は、16 例 (84.2%) みられ、DNA は比較的よい品質で保たれていた。これらの 16 例における DIN 値は、検体受取後に最大 16 日経過しても DNA 高品質を維持する検体もみられ (Fig. 2)，検体受取後から LBC-CB 作製までの検体保存日数と DIN 値に明らかな関連性はみられなかった ($r=-0.176$, $p=0.514$)。

EGFR 遺伝子変異がすでに明らかとなっているサンプル症例 No. 1 (*EGFR Exon19 deletions*) と症例 No. 18 (*EGFR Exon21 L861Q*) は、オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システムのパネル検査でも遺伝子変異を検出した。

2. セルブロックの保管と核酸品質の関係

Fig. 3 に保管していた LBC-CB から抽出したゲノム DNA の DIN 値を示す。2019 年に作製した LBC-CB5 例の DIN 値の平均値は 4.7（平均 DNA 量 $25.4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ）であった。同様に 2018 年、2017 年と 2016 年における DIN 値の平均値は、

4.5（平均 DNA 量 $43.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ），3.8（平均 DNA 量 $37.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ）と 3.2（平均 DNA 量 $44.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ）であった。すなわち、LBC-CB の長期保管は核酸品質に影響を及ぼすことが明らかとなった ($p<0.001$)。

IV. 考 察

CB 法は免疫細胞化学の導入により細胞診断の質的向上を成し遂げたのみならず、遺伝子検査の応用も期待されている手法である^{11,12)}。遺伝子検査に関して、細胞診 LBC 材料を用いた HPV 検査は世界中で広く施行されており、CB 法を含めた細胞材料を用いた遺伝子解析の応用に期待が寄せられている。今回、LBC 材料から CB を作製する LBC-CB の核酸品質の調査において、DIN 値を指標として比較検討を行った¹³⁾。その結果、サイトリッチレッドを用いた LBC-CB19 例の検討において、LBC-CB 切片表面の面積は DNA 量の指標になった。また、*EGFR* 遺伝子変異がすでに明らかとなっている 2 例の LBC-CB を用いたオンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システムのパネル検査では、同様の *EGFR* 遺伝子変異を確認できた。さらに短いながら対象期間の検体において、検体受取後から LBC-CB 作製までの検体保存日数と DIN 値に明らかな関連性はみられなかったが、LBC-CB の長期保管は核酸品質に影響を及ぼすことが明らかとなった。

本邦においてさまざまな CB 作製法が使用されており、使用目的に応じて CB 作製法が異なるかもしれない。ホルマリン重層による CB の作製法は簡便であり、免疫細胞化

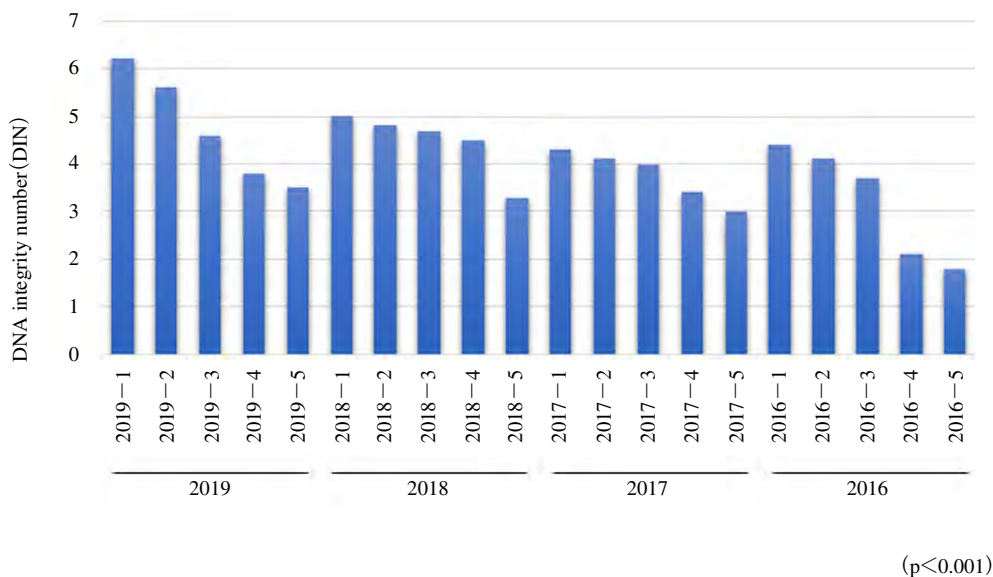


Fig. 3 Impact on the DNA integrity number (DIN) of long-term storage of liquid-based cytology cell blocks prepared from CytoRich Red samples.

学において直接塗抹したスミアよりも良好な染色性を示すため、本邦において広く汎用されている⁴⁾。一方、LBCの普及によりLBC-CBの試みやその有用性が報告されている^{7,9)}。LBC保存液・固定液には本検討に用いたサイトリッチレッドのみでなく、非婦人科用プレザーブサイト液や穿刺吸引・体腔液用セルプレップ固定液などさまざまな製品がある^{9,14,15)}。Ryuらは、セルプレップバイアルは保存期間に関係なく安定した発現を示すことを報告しており¹⁴⁾、Baoらは、ThinPrep法を用いた免疫細胞化学は細胞診断のための優れた手法であると記載している¹⁵⁾。一方、免疫細胞化学はホルマリン再固定の有無により発現結果が異なるという指摘もある¹⁶⁾。本検討で使用したサイトリッチレッド保存液には微量のホルマリンが含まれているためLBC保存液から直接LBC-CBを作製し、ホルマリン再固定は行わなかった。したがって、今後ホルマリンで再固定したLBC-CBの核酸品質を確認していく必要もある。

核酸の量と品質は、パネル検査を含めた遺伝子解析において最も重要である。DNA量に関して、LBC-CB切片表面の面積は、抽出されるDNA量と正の相関を示したため、DNA量の指標になると思われる。一方、遺伝子パネル検査に用いる検体が解析に適しているかどうかについての目安は、そのアッセイ法により幅があるものの推奨切片表面積はFoundationOne CDxがんゲノムプロファイルで $\geq 25 \text{ mm}^2$ 、NCCオンコパネルシステムで $\geq 16 \text{ mm}^2$ ($\geq 4 \text{ mm}^2$ あれば可)と記載されている¹⁷⁾。本検討に用いた症例においてLBC-CB切片表面の面積がFoundationOne CDxがんゲノムプロファイルの推奨切片表面積である 25 mm^2 以上を示

した症例数は5例(26.3%)であり、確実な遺伝子検査への応用は細胞数の確保も課題である。遺伝子検査において有核腫瘍細胞の割合は重要な指標となっており遺伝子パネル検査では、 $\geq 20\%$ の腫瘍細胞含有率が求められている¹⁷⁾。留意すべき点は、LBC-CBの切片中に含まれる細胞は、正常細胞とがん細胞が常に混在しているため、有核腫瘍細胞の割合と抽出されるDNA量は必ずしも一致しないということである。したがって、遺伝子解析成功への課題は、1. 十分ながん細胞のDNA量を確保するために臨床との連携が不可欠、2. 良好な核酸品質を保つために固定法と固定時間を選定・確認すべき、3. 有核腫瘍細胞の割合を上げるためにマクロダイゼクションを行いやすいようなCB作製、4. LBC-CB切片表面の面積が小さい場合は、より多くの切片を薄切・提供するなどが挙げられる。

DNAの品質に関して、検体受取後からLBC-CB作製までの検体保存日数(最小1日～最大16日)とDIN値に関連性はみられなかった。これは日常業務範囲内の限られた期間・日数での結果であることを考慮すべきである。一般にホルマリン固定は時間依存的に核酸を分解していくことが知られており¹⁸⁾、長い期間CBを作製せずに沈渣のまま保存しているのは好ましくないと考える。したがって、細胞の核酸品質保持のためには、可能な限りすみやかなLBC-CB作製が求められ、各施設での運用の工夫が必要である。また、体腔液などの検体採取後の保存や運搬方法の把握や施設間での統一化も重要である。当施設においてLBC処理後の残検体はLBC-CB作製まで4℃で冷蔵保存しており¹⁹⁾、これが核酸品質保持に効果を示している可能性

もあるため、今後の検証が必要である。

LBC-CBの保管に関して、LBC-CBの長期保管はFFPE組織と同様にDNAの品質不良を引き起こすことが明らかとなった¹⁸⁾。Watanabeらも同様に、長期保存したFFPEはDNAの分解が進んでいると報告している²⁰⁾。資料室の管理状態は各施設において異なるが、FFPE組織の保管は多湿を避け冷暗所が望ましく、ゲノム診断を目的として作成されたFFPEブロックは、冷蔵下の保存が望ましいとの記載があるため¹⁸⁾、LBC-CBの保管に関しても可能なかぎりこれに準ずることが望ましいと考える。

V. 結 語

一定期間中に日常業務で作製されたLBC-CBの切片表面の面積、有核腫瘍細胞の割合、DNA量やDIN値を比較した結果、LBC-CBにおける核酸の状態や運用の問題点を確認することができた。LBC-CBの核酸品質は良好であるため十分なDNA量の確保によりさまざまな遺伝子検査への応用が可能になると考える。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Objective : We investigated the nucleic acid quality in sodium alginate cell blocks (CBs) prepared from liquid-based cytology (LBC) specimens, and evaluated the impact of long-term storage of the LBC-CBs on the nucleic acid quality.

Study Design : We analyzed the nucleic acid quality in LBC-CBs prepared from effusion fluid in 19 patients with lung or ovarian cancer between January and March 2020. The impact of long-term storage of the LBC-CBs on the nucleic acid quality was also analyzed.

Results : The cytological findings of the LBC-CBs were satisfactory and the CB area was related to the DNA quantity ($r=0.808$). In regards to the impact of long-term storage, the DNA integrity number (DIN) could be calculated in 16 of the 19 cases (84.2%) and the DNA quality was relatively good. The length of time that the samples had been stored (days) prior to preparation of the LBC-CBs had no significant effect on the DIN ($r=-0.176$), whereas long-term sample storage (years) was associated with some deterioration of the DNA quality ($p<0.001$).

Conclusion : The nucleic acid quality in LBC-CBs was excellent, and if an adequate amount of DNA is collected, it could be possible to use samples prepared by this method for a variety of genetic tests.

文 献

- 1) Noda, Y., Fujita, N., Kobayashi, G., Itoh, K., Horaguchi, J., Takasawa, O., et al. Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol* 2010 ; 45 : 868-875.
- 2) 信広亮輔, 柴田 淳, 小林 剛, 脇本真帆, 佐々木なおみ. 消化器および体腔液細胞診における簡易セルブロック作製法併用の有用性. *医学検査* 2015 ; 64 : 196-201.
- 3) Wilgenbusch, H., Molm, C., Aslan, D., Berg, B. It is all in the bag : collodion bag versus HistoGel cell block method. *J Am Soc Cytopathol* 2020 ; 9 : 20-25.
- 4) 細胞検査士会, 編. 細胞診標本作製マニュアル体腔液 3 血性検体の処理法 (第 1 版). 東京 : 細胞検査士会 ; 2008.
- 5) Tanaka, R., Sakamoto, N., Suzuki, H., Tachibana, K., Ohtsuka, K., Kishimoto, K., et al. Genotyping and cytomorphological subtyping of lung adenocarcinoma based on liquid-based cytology. *Diagn Cytopathol* 2019 ; 47 : 564-570.
- 6) Torous, V. F., Chen, Y., VanderLaan, P. A. Comparison of plasma-thrombin, HistoGel, and CellGel cell block preparation methods with paired ThinPrep slides in the setting of mediastinal granulomatous disease. *J Am Soc Cytopathol* 2019 ; 8 : 52-60.
- 7) Tanaka, R., Ohtsuka, K., Ogura, W., Arai, N., Yoshida, T., Nakazato, Y., et al. Subtyping and EGFR mutation testing from blocks of cytological materials, based on liquid-based cytology for lung cancer at bronchoscopic examinations. *Diagn Cytopathol* 2020 ; 48 : 516-523.
- 8) van Hemel, B. M., Suurmeijer, A. J. Effective application of the methanol-based PreservCyt™ fixative and the Cellient™ automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry, and molecular biology. *Diagn Cytopathol* 2013 ; 41 : 734-741.
- 9) 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 : 145-152.
- 10) Ley, T. J., Mardis, E. R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M. D., Chen, K., et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukemia genome. *Nature* 2008 ; 456 : 66-72.
- 11) Xie, F., Zheng, X., Mao, X., Zhao, R., Ye, J., Zhang, Y., et al. Next-generation sequencing for genotyping of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration samples in lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2019 ; 108 : 219-226.
- 12) Zhang, Y., Li, J., Hua, P., Liu, N., Li, Q., Zhu, X., et al. Targeted next-generation sequencing in cytology specimens for molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2018 ; 11 : 3647-3655.
- 13) Mathieson, W., Guljar, N., Sanchez, I., Sroya, M., Thomas, G. A.

- Extracting DNA from FFPE tissue biospecimens using user-friendly automated technology : Is there an impact on yield or quality? *Biopreserv Biobank* 2018 ; 16 : 191-199.
- 14) Ryu, A., Ashimura, J. I., Nakayama, T., Tamaki, Y., Nakatsuka, S. I., Tomita, Y. Reliability of estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor 2 expression on breast cancer cells stored in Cellprep[®] Vials. *Acta Cytol* 2018 ; 62 : 360-370.
- 15) Bao, H., Wu, Y. p16^{INK4A} and Ki-67 immunostaining on cell blocks from residual ThinPrep material is helpful in identifying significant preneoplastic cervical lesions. *Pathol Res Pract* 2011 ; 207 : 216-219.
- 16) Gong, Y., Sun, X., Michael, C. W., Attal, S., Williamson, B. A., Bedrossian, C. W. Immunocytochemistry of serous effusion specimens : a comparison of ThinPrep vs cell block. *Diagn Cytopathol* 2003 ; 28 : 1-5.
- 17) 日本肺癌学会バイオマーカー委員会, 編. 肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き (第 1.1 版). 日本肺癌学会 ; 2019.
- 18) 日本病理学会, 編. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 (初版). 東京 ; 日本病理学会 ; 2018.
- 19) Groelz, D., Viertler, C., Pabst, D., Dettmann, N., Zatloukal, K. Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0203608.
- 20) Watanabe, M., Hashida, S., Yamamoto, H., Matsubara, T., Ohtsuka, T., Suzawa, K., et al. Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. *Exp Ther Med* 2017 ; 14 : 2683-2688.
-

症 例

多彩な像を示した乳腺化生癌の穿刺吸引細胞診の 1 例

青木 章乃¹⁾ 櫛谷 桂²⁾ 佐々木健司³⁾ 神田 真規³⁾
武島 幸男²⁾

JA 広島厚生連吉田総合病院病理研究検査科¹⁾, 広島大学大学院医系科学研究科病理学研究室²⁾,
JA 広島厚生連尾道総合病院病理研究検査科³⁾

背景：乳腺化生癌はまれな乳腺悪性腫瘍である。ここで提示する症例は多彩な像を示した乳腺化生癌の穿刺吸引細胞診の 1 例である。

症例：70 歳代，女性。人間ドックにて左乳房 C 領域に腫瘤を指摘された。穿刺吸引細胞診では，採取細胞量は豊富であり，上皮性結合を示す異型多角形細胞と異型紡錘形細胞を認め，両者間には移行像がみられた。また，硝子様物質に取り囲まれた異型細胞集団もみられた。免疫細胞化学的所見も考慮し化生癌を推定した。病理組織学的には，腫瘍は扁平上皮癌を主体とし，一部に紡錘細胞癌の成分を伴う混合型化生癌であった。

結論：本腫瘍の診断には，免疫細胞化学的検査の併用が有用であると考え。

Key words : Breast, Fine-needle aspiration cytology, Metaplastic carcinoma, Case report

I. はじめに

乳腺化生癌は乳腺浸潤癌の 0.2~5% と比較的まれな悪性腫瘍である。乳癌取り扱い規約（第 18 版）では特殊型乳癌の一項目として独立し，扁平上皮癌や間葉系分化を伴う癌が含まれている。ここでは，多彩な像を示した乳腺化生癌の 1 例を提示する。

II. 症 例

患 者：70 歳代，女性。

主 訴：左乳房の違和感。

既往歴：特記すべきことなし。

現病歴：左乳房の違和感を自覚したため，当院人間ドックを受診した。マンモグラフィー検査は要精査（カテゴリー 4）であったことから，当院外科に紹介された。触診では，左乳房 C 領域に約 2.5 cm 大の腫瘤が触知され，穿刺吸引細胞診および針生検が行われた。細胞診，針生検ともに悪性と診断されたことから，非定型的左乳房切除術およびセンチネルリンパ節生検を受けた。手術摘出標本は組織学的に混合型化生癌と診断された。

マンモグラフィー所見：左乳房 U-O 領域に境界不明瞭，不整形の高濃度腫瘤像を認めカテゴリー 4 と判定された（Photo. 1a）。

超音波所見：左乳房 C 領域に境界不明瞭な 24.9×11.7×14.9 mm 大の低エコー腫瘤像を認めた。後方エコーは増強していた（Photo. 1b）。

CT 所見：左乳房 C 領域に 27×19 mm の腫瘤像を認めた。肺，肝臓に転移を示唆する所見は認められなかった。

Fine-needle aspiration cytology evaluation of metaplastic breast carcinoma showing histological diversity—A case report—

Ayano AOKI¹⁾, C. T., I. A. C., Kei KUSHITANI²⁾, M. D., Kenji SASAKI³⁾, C. T., I. A. C., Masanori KODA³⁾, C. T., I. A. C., Yukio TAKESHIMA²⁾, M. D.

¹⁾Department of Pathology, JA Yoshida General Hospital

²⁾Department of Pathology, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

³⁾Department of Pathology, JA Onomichi General Hospital

論文印刷請求先 〒 731-0595 広島県安芸高田市吉田町吉田 3666
JA 広島厚生連吉田総合病院病理研究検査科 青木章乃

令和 2 年 1 月 28 日受付

令和 2 年 3 月 1 日受理

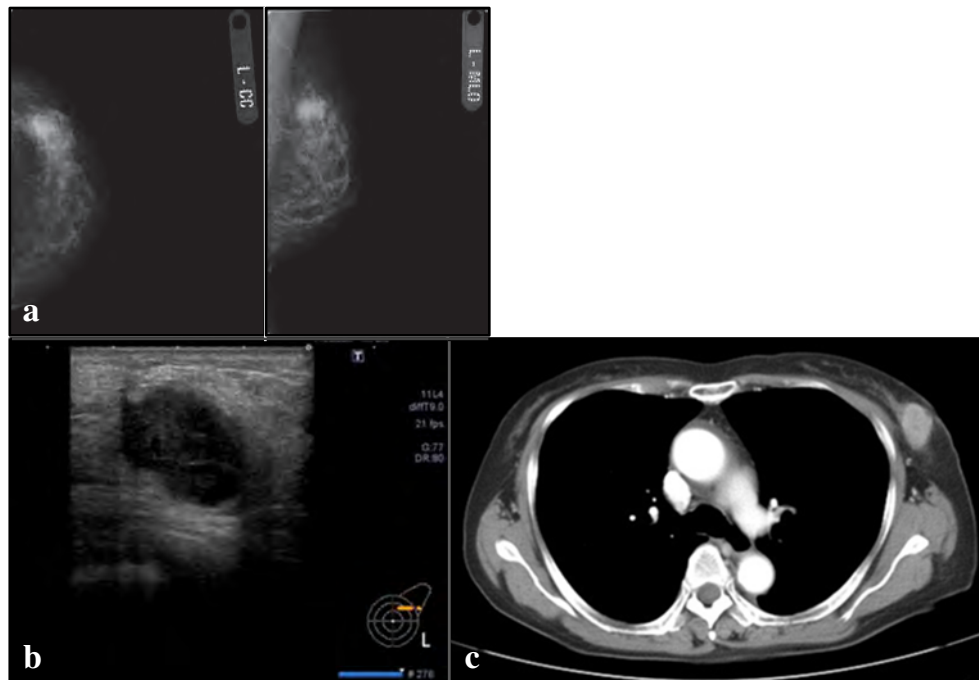


Photo. 1 a : Mammography showed an irregularly shaped high-density mass in the left breast.
 b : Ultrasonography showing a low-echoic mass with an indistinct border.
 c : Computed tomography showing a mass in the C-portion of the left breast.

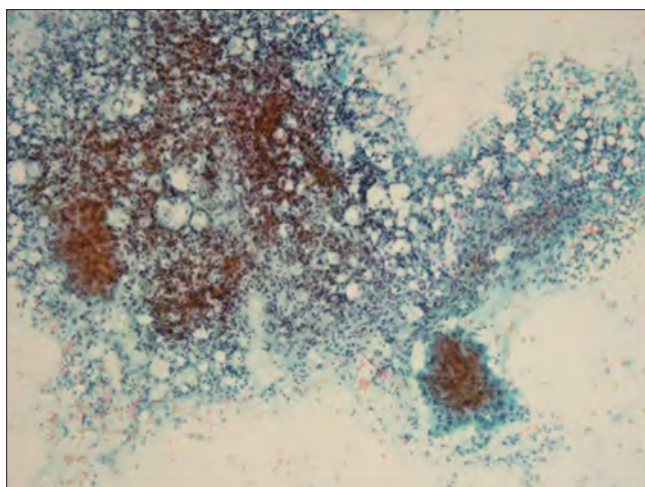


Photo. 2 Cell clusters showing epithelial connections and solitary cells are observed (Pap. staining, $\times 10$).

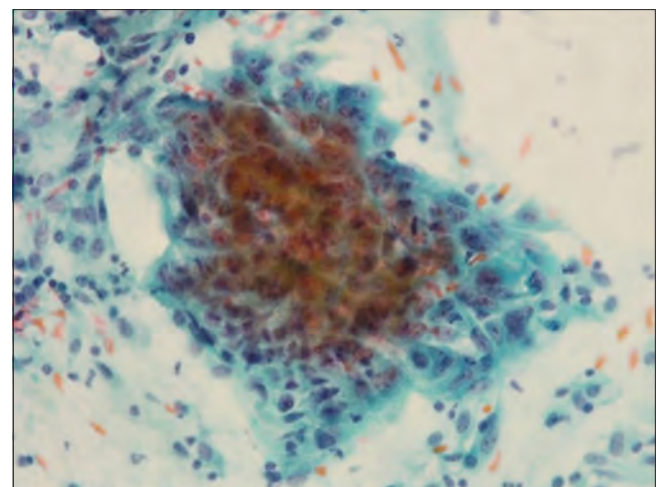


Photo. 3 The epithelial cells are polygonal and show nuclear atypia (Pap. staining, $\times 40$).

(Photo. 1c).

術後経過：術後 6 週間経過した後，補助療法として 5-Fluorouracil 500 mg/m², Epirubicin 100 mg/m², Cyclophosphamide 500 mg/m² (FEC100) を導入したが，1 コース目で grade 3 の消化器症状が出現したため，本人希望により 2 コース目以降は中断した．術後 2 年経過した現在，CT 検査では再発や転移を認めず，外来経過観察中である．

III. 穿刺吸引細胞所見

採取細胞量は豊富であり，上皮性結合を示す異型多角形細胞とその周囲を取り囲むように異型紡錘形細胞が認められた (Photo. 2)．異型多角形細胞と異型紡錘形細胞は連続性を示した．異型多角形細胞の核は類円形で大小不同がみられ，核形不整を示す細胞も認めた．クロマチンは粗顆粒

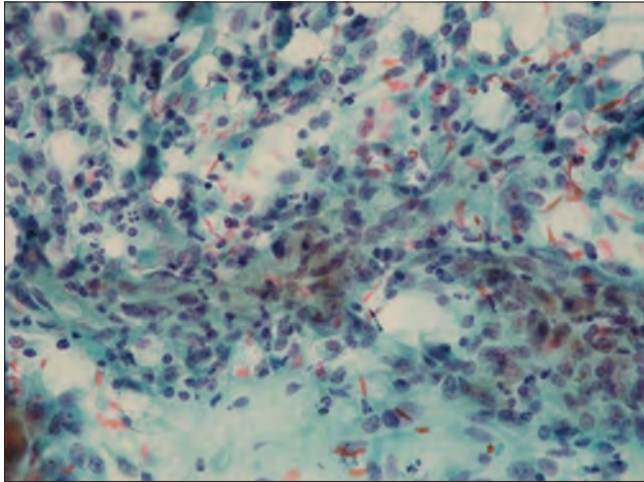


Photo. 4 Atypical spindle cells are seen, and neutrophils and lymphocytes are observed in the background (Pap. staining, ×40).

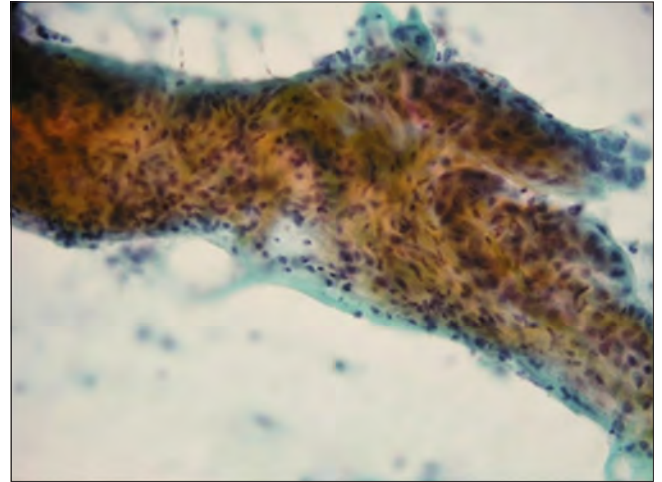


Photo. 5 Atypical polygonal cell clusters surrounded by a cyanophilic hyalin-like substance (Pap. staining, ×40).

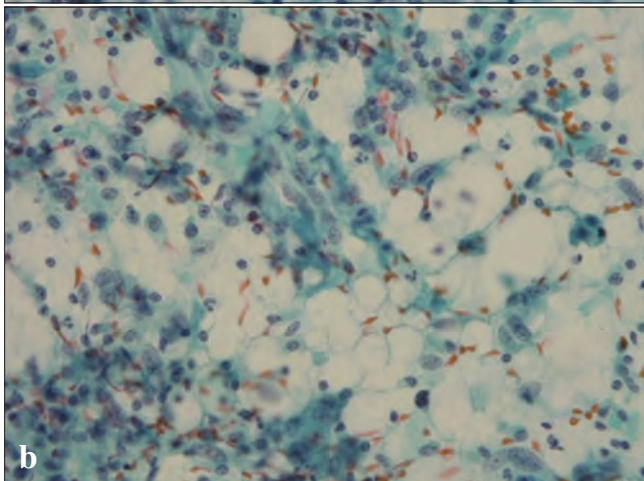
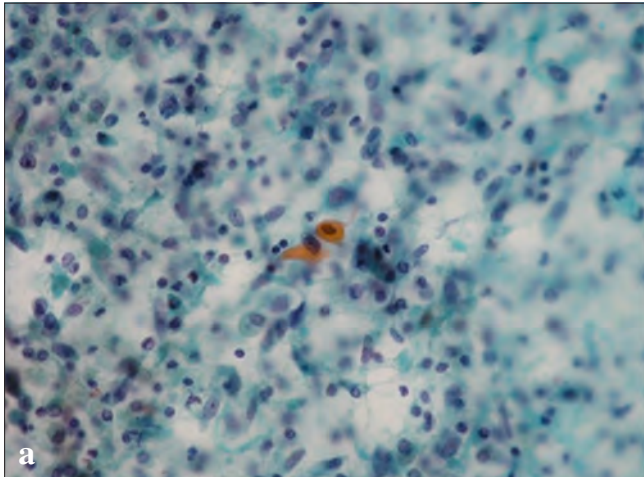


Photo. 6 a : Orogenophilic atypical cells are seen (Pap. stain, ×40).
b : Atypical spindle cells infiltrating adipose tissue (Pap. staining, ×40).

Table 1 Immunocytochemical findings

	Atypical polygonal cells	Atypical spindle cells
AE1/AE3	+	±
CK5/6	+	±
CAM5.2	+	±
p40	+	±
vimentin	—	+
S-100 protein	—	—

— : negative + : positive ± : focally positive

状で増量し、1個から2個の大型核小体を認めた (Photo. 3)。異型紡錘形細胞の核は紡錘形から楕円形で、大小不同や核形不整がみられ、巨大な核をもつ細胞もみられた。クロマチンは細顆粒状で増量し、小型核小体が1個から2個認められた。異型紡錘形細胞周囲には多数の好中球やリンパ球が混在していた (Photo. 4)。他の部位では、ライトグリーン好性の硝子様物質に囲まれた異型多角形細胞集団 (Photo. 5) や異型角化細胞を少数認めた (Photo. 6a)。また、異型紡錘形細胞の脂肪組織浸潤像もみられた (Photo. 6b)。標本中には、明らかな腺管構造を示す細胞集塊は認められなかった。免疫細胞化学的には、異型多角形細胞は cytokeratin-AE1/AE3 (AE1/AE3), cytokeratin5/6 (CK5/6), cytokeratin-CAM5.2 (CAM5.2) および p40 に陽性を示した。異型紡錘形細胞は vimentin にびまん性に陽性、AE1/AE3, CK5/6, CAM5.2 および p40 に一部で陽性を示した (Table 1, Photo. 7)。以上の所見より、扁平上皮癌と紡錘細胞癌、基質産生癌が混在する混合型化生癌が推定された。

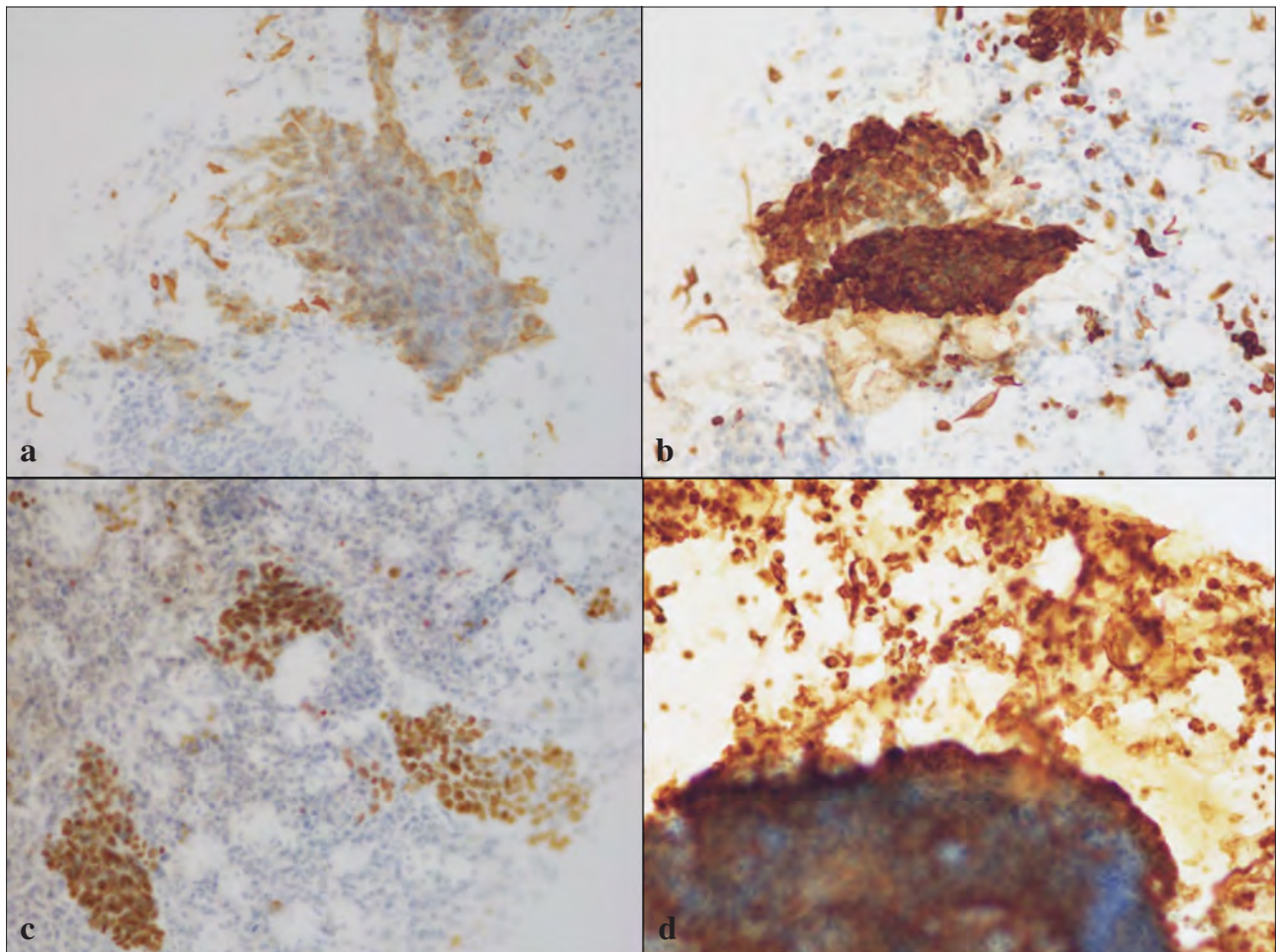


Photo. 7 Immunocytochemical findings.

a : CK5/6 $\times 40$, b : CAM5.2 $\times 40$, c : p40 $\times 40$, d : vimentin $\times 40$.

The atypical polygonal cells were positive for CK5/6, CAM5.2, and p40 (a-c), and the atypical spindle cells were diffusely positive for vimentin (d) and partially positive for CK5/6, CAM5.2, and p40.

IV. 病理組織学的所見

針生検病理組織学的所見：多角形ないし扁平な異型細胞が胞巣を形成して浸潤性に増殖する腫瘍組織を認めた。免疫組織化学的には、腫瘍細胞は CK5/6, p40 にびまん性に陽性を示し、扁平上皮癌と診断した。

手術摘出標本の病理組織学的所見：左乳房の剖面では、20 mm $\times$ 16 mm 大の境界明瞭、灰白色で一部暗赤色を呈する腫瘍組織を認めた (Photo. 8)。病理組織学的には主に多角形ないし扁平な異型上皮細胞が豊富な線維性間質の増生を伴って増殖する腫瘍組織からなっていた (Photo. 9a)。腫瘍細胞は充実性胞巣状ないしシート状に増殖し、わずかながら squamous eddy や個細胞角化像を認めた (Photo. 9b)。また、高度な核異型を示す紡錘形細胞が錯綜性に増殖する領域を認め、異型上皮細胞との間に移行像がみられた

(Photo. 9c)。さらに別の部位では、間質に硝子様基質を認め、基質成分中に類円形から多角形の異型細胞が索状あるいは孤立性にみられた (Photo. 9d)。標本中には明らかな腺管構造は認められなかった。センチネルリンパ節における癌の転移は陰性であった。免疫組織化学的には、異型多角形細胞は AE1/AE3, CK5/6, CAM5.2, p40 に陽性を示した。異型紡錘形細胞は AE1/AE3, CK5/6, p40 に陰性ないし部分陽性、CAM5.2 に弱陽性を示した。硝子様基質を伴う部分では AE1/AE3, CAM5.2 がびまん性に陽性、CK5/6 が部分的に陽性を示したが、p40 は陰性であった (Photo. 10)。estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) はともに陰性であり、HER2 蛋白は 1+ であった (Table 2)。以上の所見より、扁平上皮癌と紡錘細胞癌が混在する混合型化生癌と診断した。硝子様基質を伴う部分は形態学的には基質産生癌に類似する像であったが、基質がトリジンブルー染色でメタクロマジーを示さず、明

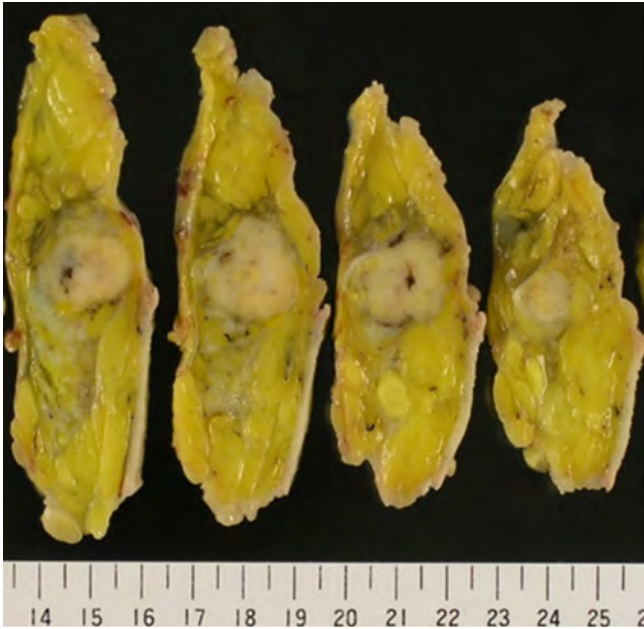


Photo. 8 Cut-surface of the mass showing a solid, grayish-white mass with focal hemorrhage.

瞭な骨基質の産生も認めなかったことから、基質産生癌は否定的であり、免疫形質を考慮し低分化な扁平上皮癌と考えた。

V. 考 察

乳腺化生癌は乳腺浸潤癌の0.2～5%とまれな悪性腫瘍であり、他の浸潤性乳癌に比べ予後不良とされている^{1,2)}。乳癌取り扱い規約（第18版）では、特殊型乳癌の一つであり、“扁平上皮癌”（低異型度腺扁平上皮癌を含む），“間葉系分化を伴う癌”，両者の混在する“混合型”に分類される。間葉系分化を伴う癌には紡錘細胞癌、骨・軟骨化生を伴う癌、基質産生癌が含まれる。さらに扁平上皮癌は「扁平上皮化生を伴う癌で、癌胞巣が単に重層を示すだけでなく、角化あるいは細胞間橋のみられるもの」をいうと定義づけられている³⁾。通常、おのこのの化生成分が均一にみられるのはまれで実際の症例は多彩で複雑であり、分類はどの化生成分がどの程度みられるかによらざるをえない^{4,5)}。本例の針生検組織標本では扁平上皮癌のみがみられた。手術材料組織標本では、扁平上皮癌のほかに紡錘細胞癌の成分

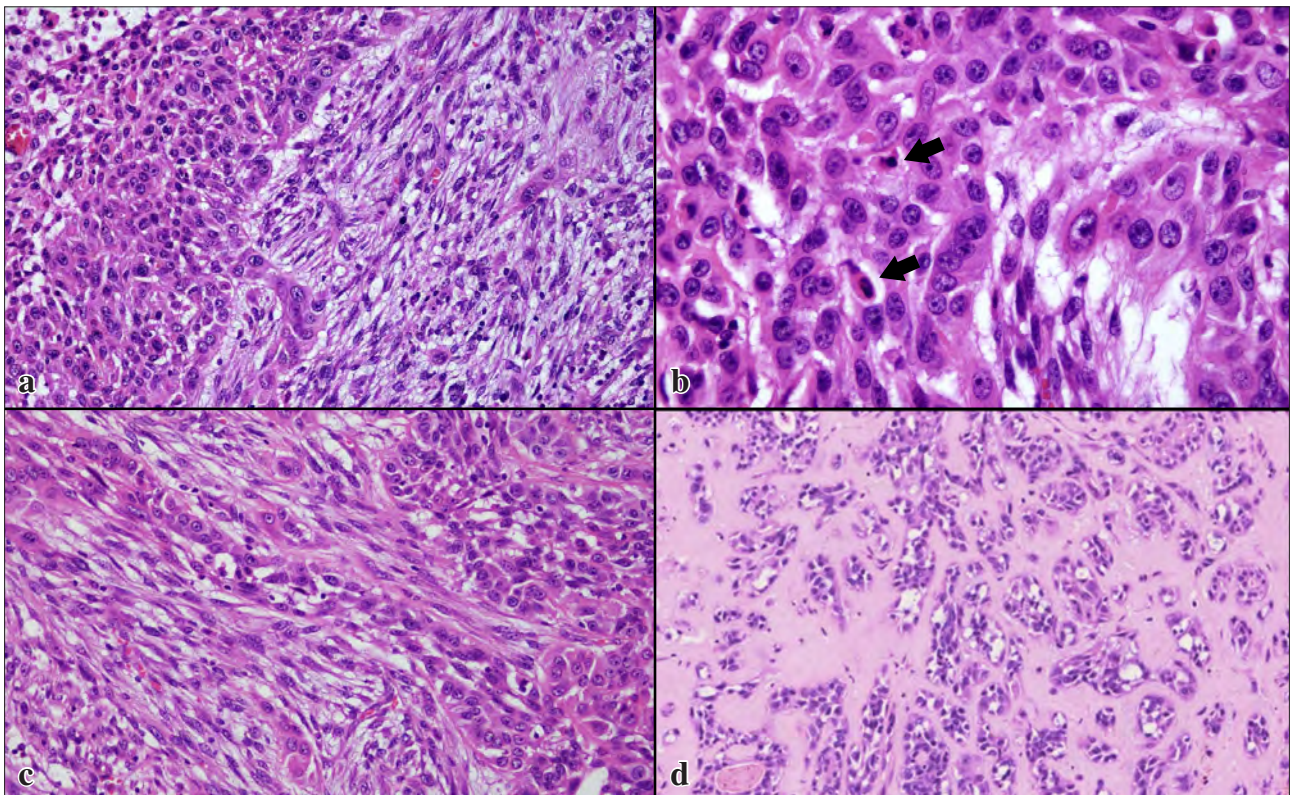


Photo. 9 a : Proliferation of atypical polygonal or spindle cells with a desmoplastic stroma (H & E staining, $\times 20$).
 b : Tumor cells forming solid nests with individual cell keratinization (arrow) (H & E staining, $\times 40$).
 c : Proliferation of highly atypical spindle cells (H & E staining, $\times 20$).
 d : Round-to-polygonal atypical cells are observed in a hyaline-like matrix (H & E staining, $\times 10$).

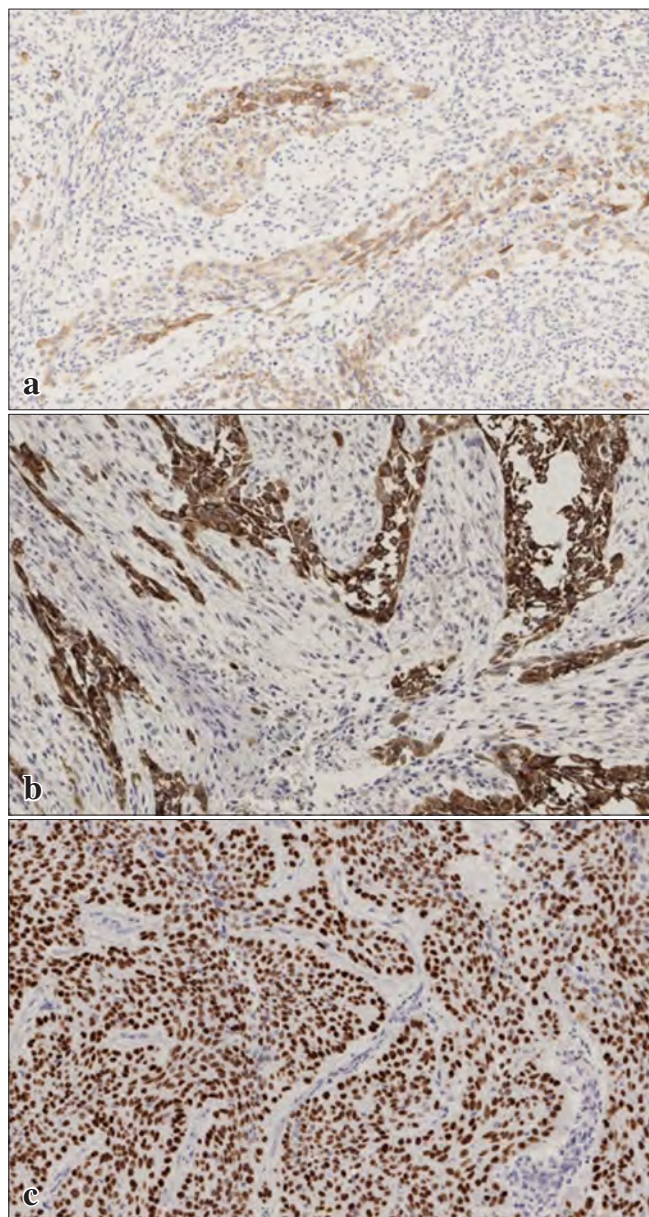


Photo. 10 Immunohistochemical findings.

a : CK5/6, high magnification ($\times 20$), b : CAM5.2, high magnification ($\times 20$), c : p40, high magnification ($\times 20$). The atypical polygonal cells were positive for CK5/6, CAM5.2, and p40, and the atypical spindle cells were negative or partially positive for CK5/6 and p40, and weakly positive for CAM5.2.

を認めたため、混合型化生癌とみなした。乳腺化生癌の穿刺吸引細胞所見についての報告例は少ない。腫瘍捺印材料の場合は各腫瘍の特徴的所見が観察されるが、穿刺吸引細胞診では、腫瘍の部分像のみの所見となるため、扁平上皮癌を除いてほかの組織型を推定することは容易でない。乳腺扁平上皮癌の細胞像について犬塚らは、①壊死物質を背景に、角化傾向の強い多彩性に富む奇怪な形の細胞がみら

Table 2 Immunohistochemical findings

	Atypical polygonal cells	Atypical spindle cells	Matrix-producing area
AE1/AE3	+	±	+
CK5/6	+	±	±
CAM5.2	+	+ weak	+
p40	+	±	—
ER	—	—	—
PgR	—	—	—
HER2	1+	—	—

— : negative + : positive ± : focally positive

れること、②細胞質はオレンジ G 好性、時に多染性を示すこと、③核は中心性で核形不整が強く、クロマチンは粗大顆粒状であること、④小型不整形核小体を数個認めることもあること、⑤細胞質がライトグリーン好性で重厚感のある細胞がみられることと報告している⁶⁾。本例ではオレンジ G 好性細胞は少なかったが、核の位置や細胞質所見より、これらの細胞は扁平上皮癌として矛盾しないと考えた。

本例では異型多角形細胞のほか、紡錘形細胞が多数認められた。紡錘形細胞は異型を示したが、角化が目立たないことから、パパニコロウ染色のみでは扁平上皮癌細胞と断定することは容易ではなかった。そのため、紡錘形細胞の由来を特定するために免疫細胞化学的検索を行った。紡錘形細胞は vimentin にびまん性に陽性、AE1/AE3, CK5/6, p40 に陰性から部分陽性であり、免疫細胞化学的には扁平上皮癌や紡錘細胞癌が疑われた。紡錘細胞癌の細胞学的特徴についての報告例は少ないが、①壊死組織や粘液様物質を背景に紡錘形を主体とした肉腫様細胞がみられ、細胞間結合は乏しいこと、②多核巨細胞が混在しているが、決して間葉系組織への分化はみられないこと、③核は楕円形ないし長楕円形で、大小不同性や濃染性がみられ、明瞭な核小体を有していること、④紡錘細胞癌ではこれに混在して重積性を有する通常の腺癌細胞がみられ、核は類円形均一であるが、濃染性や核小体は肉腫様細胞のそれと似ること、⑤時に癌腫細胞と肉腫様細胞の移行像が認められること⁷⁾と報告されている。本例には粘液様物質や多核巨細胞、腺癌成分はみられなかったが、他の所見は報告されている紡錘細胞癌に一致した。

組織学的診断では否定されたが、本例では少数ながらライトグリーン好性の硝子様物質に取り囲まれた異型多角形細胞集団が認められ、基質産生癌の存在も疑われた。基質産生癌の穿刺吸引細胞所見は、①細胞量が豊富であり、ヘマトキシリンに淡染する粘液様の軟骨基質が認められること、②類円形を呈する悪性細胞が集簇性あるいは弧在性に出現し、両者の移行像が認められることと報告されてい

る。また、粘液性の背景に立方状～卵円形の N/C 比の高い腫瘍細胞がシート状に配列し、基質成分に包まれるようにして存在することが多い⁸⁾とも報告されており、本例の細胞像にはほぼ一致し、基質産生癌の存在を疑った。

乳腺扁平上皮癌の細胞学的鑑別診断としては、良性扁平上皮化生細胞、転移性扁平上皮癌、腺扁平上皮癌が挙げられる^{1,9,10)}。良性扁平上皮化生細胞とは細胞異型の点で鑑別可能であった。転移性扁平上皮癌とは特記すべき既往歴がなく他臓器に腫瘍性病変が認められなかった点で、腺扁平上皮癌とは腺癌成分が認められなかった点で鑑別可能であった。紡錘形細胞が出現していることから葉状腫瘍や肉腫との鑑別を要するが、葉状腫瘍では異型の弱い大型の乳管上皮細胞集塊が出現し、本例の所見とは合致しない。また、肉腫とは異型多角形細胞が認められた点や骨、軟骨、横紋筋などの特定の軟部組織系統への分化を示唆する細胞所見が認められなかった点で鑑別可能であった。本例ではリンパ球を中心とする炎症細胞を多数認め、IgG4 関連疾患による乳腺炎や肉芽腫性乳腺炎との鑑別が必要となるが、本例では異型的な上皮細胞、紡錘形細胞が認められる点で鑑別可能であった。

以上、多彩な像を示した乳腺化生癌について穿刺吸引細胞像を中心に報告した。化生癌では通常の細胞診標本に加え、免疫細胞化学的検索が組織型の推定に有用であると考ええる。

著者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Background : Metaplastic breast carcinoma is rare. We present a case of histologically diverse metaplastic breast carcinoma diagnosed by fine-needle aspiration cytology.

Case : A woman in her 70s was incidentally detected to have a mass in the C-portion of her left breast during a medical checkup. Fine-needle aspiration cytology revealed abundant cell clusters, including atypical polygonal cells with epithelial connections and atypical spindle cells. There appeared to be a transition between the polygonal and spindle cells. In addition, we observed atypical cell clusters surrounded by a hyaline-like substance. Based on the results of immunocytochemical

analysis of the aspiration specimen, we diagnosed the patient as having metaplastic breast carcinoma. Histopathological examination showed a mixture of squamous cells and spindle cells, and the lesion was diagnosed as a mixed-type metaplastic breast carcinoma.

Conclusion : Immunocytochemical evaluation is useful for the diagnosis of mixed-type metaplastic breast carcinoma.

文 献

- 1) Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., et al., eds. WHO Classification of Tumors of the Breast, 4th ed. Lyon : IARC Press ; 2012. 48-52.
- 2) Luini, A., Aguirre, M., Gatti, G., et al., eds. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis : the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. Breast Cancer Res Treat 2007 ; 101 : 349-353.
- 3) 日本乳癌学会, 編. 臨床・病理 乳癌取り扱い規約 第 18 版. 東京 : 金原出版 ; 2018.
- 4) 山口 倫. 乳癌Ⅱ 組織型診断のコツ おさえておきたい組織型 化生癌. 病理と臨床 2008 ; 26 : 1151-1153.
- 5) 中井登紀子, 市原 周. 乳腺Ⅰ 改訂乳癌取り扱い規約分類の考え方 組織型診断のコツ おさえておきたい組織型 特殊型乳癌 (2) 髄様癌, アポクリン癌, 化生癌. 病理と臨床 2018 ; 36 : 879-884.
- 6) 犬塚 央, 阿南敬生, 勝本富士夫, 玉江景好, 光山昌珠. 乳腺扁平上皮癌の 9 例 診断上の特性について. 日臨外会誌 2001 ; 62 : 2145-2150.
- 7) 土井貴司, 羽場礼次, 船本康申, 河野幸治, 松永 徹, 岸田不二夫・ほか. 乳腺原発紡錘細胞癌の 2 例. 日臨細胞会誌 2006 ; 45 : 27-31.
- 8) Murata, T., Ihara, S., Kato, H., Tanigawa, K., Higashiguchi, T., Imai, T., et al. Matrix-producing carcinoma of the breast : case report with radiographical and cytopathological features. Pathol Int 1998 ; 48 : 824-828.
- 9) Fattaneh, A. T., Vincenzo, E. Atlas of tumor Pathology (Four Series), Tumors of the Mammary Gland (Fascicle 10). Washington : Armed Forces Institute of Pathology ; 2009. 218-221.
- 10) 井関 文, 畠 榮, 原 稔昌, 稲垣恵章, 安藤善孝, 下山芳江・ほか. 乳腺扁平上皮癌の 1 例. 医学検査 2018 ; 67 (5) : 809-815.

症 例

子宮内膜細胞診が契機となり腹腔鏡下手術で診断しえた
右卵巢微小漿液性境界悪性腫瘍の1例長尾 瑞歩¹⁾ 御船 華奈¹⁾ 辰島 純二¹⁾ 入江 愛子¹⁾堀江 靖²⁾ 大拙 祐治³⁾ 周防 加奈⁴⁾ 皆川 幸久⁴⁾鳥取県立厚生病院中央検査室¹⁾, 鳥取大学医学部附属病院病理診断科²⁾,鳥取県立厚生病院病理診断科³⁾, 同 産婦人科⁴⁾

背景：卵巢悪性腫瘍は、経卵管的な腫瘍細胞の迷入により子宮内膜細胞診で異常を示すことが知られているが、境界悪性腫瘍での報告はまれである。

症例：50歳代。前医で内膜細胞診陽性のため、精査目的に当院を紹介受診した。内膜細胞診では、シート状の正常萎縮内膜細胞集塊に混じて砂粒体を伴うN/C比の高い比較的大型の異型細胞からなる小集塊をわずかに認め、漿液性癌を疑った。しかし画像検査および子宮鏡下内膜組織検査では明らかな異常を指摘できなかった。早期の子宮付属器腫瘍を疑い、腹腔鏡下手術を施行した。摘出した両側付属器に肉眼的異常は認めず、全割による標本作製を行ったが当初の標本では明らかな腫瘍成分は見出せなかった。術中、ダグラス窩に認められた少量の腹水の細胞診標本には内膜細胞診で認められたものと類似の異型細胞像を認め、腺癌の存在を推定した。さらなる原発巣の検索を行ったが、腫瘍性病変は指摘できなかった。そのためブロック標本の深切りによる再評価を行ったところ、微小病変ながら砂粒体を伴う卵巢表層の漿液性境界悪性腫瘍を認めた。

結論：子宮内膜細胞診が契機となり、卵巢微小漿液性境界悪性腫瘍の発見に至ったまれな1例を経験した。

Key words : Ovary, Cytology, Serous borderline tumor, Psammoma body

I. はじめに

卵巢悪性腫瘍は、腫瘍細胞が経卵管的に子宮内に迷入することにより、内膜細胞診あるいは頸部細胞診で発見されることがある。しかしながら境界悪性腫瘍での報告は極めてまれである¹⁾。今回、子宮内膜細胞診が陽性であるが術前画像検査で病変を指摘できず、腹腔鏡下手術を施行し診断に至った右卵巢微小漿液性境界悪性腫瘍を経験したので報告する。

II. 症 例

患 者：50歳代，3経妊3経産。

既往歴：高脂血症。

A case of ovarian serous borderline tumor diagnosed by endometrial cytology and treated by laparoscopic salpingo-oophorectomy

Mizuho NAGAO¹⁾, C. T., J. S. C., Hana MIFUNE¹⁾, C. T., J. S. C., Junji TATSUSHIMA¹⁾, C. T., J. S. C., Aiko IRIE¹⁾, C. T., I. A. C., Yasushi HORIE²⁾, M. D., Yuji OHTSUKI³⁾, M. D., Kana SUO⁴⁾, M. D., Yukihisa MINAGAWA⁴⁾, M. D.

¹⁾Department of Central Medical Laboratory, Tottori Prefectural Kousei Hospital

²⁾Department of Pathology, Tottori University Hospital

³⁾Department of Pathology, ⁴⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Tottori Prefectural Kousei Hospital

論文別刷請求先 〒682-0804 鳥取県倉吉市東昭和町150 鳥取県立厚生病院中央検査室 長尾瑞歩

令和2年5月8日受付

令和2年6月3日受理

現病歴：前医における市町村検診時に本人希望により施行した子宮内膜細胞診が陽性となり、精査目的に当院を紹介受診された。当院で施行した内膜細胞診でも比較的大型の腺系異型細胞が集塊を形成し、砂粒体も存在することなどから子宮付属器原発の漿液性癌を疑った。経陰超音波、骨盤部 MRI および CT では、明らかな腫瘍形成や腹水貯留を認めなかった。子宮鏡では内膜は萎縮状で、明らかな腫瘍性病変は認めず、全面搔爬により得られた内膜は極少量で組織学的異常はみられなかった。腫瘍マーカーは CA125 : 8.7 U/ml, CA19-9 : 2.6 U/ml, CEA : 1.3 ng/ml といずれも基準値内であった。初期の卵巣癌または卵管癌を疑い、腹腔鏡下両側付属器摘出術を施行したが、肉眼的に異常所見はみられなかった。当初の組織標本では明らかな腫瘍は認められなかった。一方術中に認めた少量の腹水の細胞診標本では、内膜細胞診で観察できたものと類似する砂粒体を伴い腺癌を疑う異型細胞集塊を認めた。さらなる原発巣の検索のため上部および下部消化管の精査を行ったが異常は認めなかった。当初は原発巣不明として経過観察としていたが、摘出卵巣標本の深切りによる精査を行ったところ、右卵巣表層の一部に 1 mm 大の漿液性境界悪性腫瘍を認めた。追加治療としてダグラス窩腹膜切除を含めた子宮全摘術、骨盤内および傍大動脈リンパ節生検、大網切除術を施行したが、追加摘出標本すべてに腫瘍成分は認めなかった。

III. 細胞学的所見

子宮内膜細胞診：清明な背景に、シート状の正常内膜細胞を主体とする萎縮内膜像であった。極めて少数ながら比較的大型で均一な細胞からなる核密度の高い小集塊を認めた。集塊を形成する細胞の核異型は強くないが、N/C 比が高く、微細顆粒状クロマチンの増量、小型核小体がみられ、核は偏在性を示した (Photo. 1a)。集塊内には同心円状の内部構造をみる砂粒体を認めた (Photo. 1b)。さらに内膜腺細胞には明らかな異型は認められず、経卵管的に迷入した子宮付属器原発の漿液性癌を疑った。

腹水細胞診：結合性が強く核密度の高い乳頭状構造や異常重積を示す細胞集塊を認めた。核異型は乏しいものの、N/C 比が高く、クロマチン増量、核縁の肥厚がみられた。内膜細胞診同様に集塊内には砂粒体を伴っており漿液性癌を推定した (Photo. 1c)。

IV. 病理学的所見

肉眼的所見：両側卵巣は萎縮しており、明らかな腫瘍性

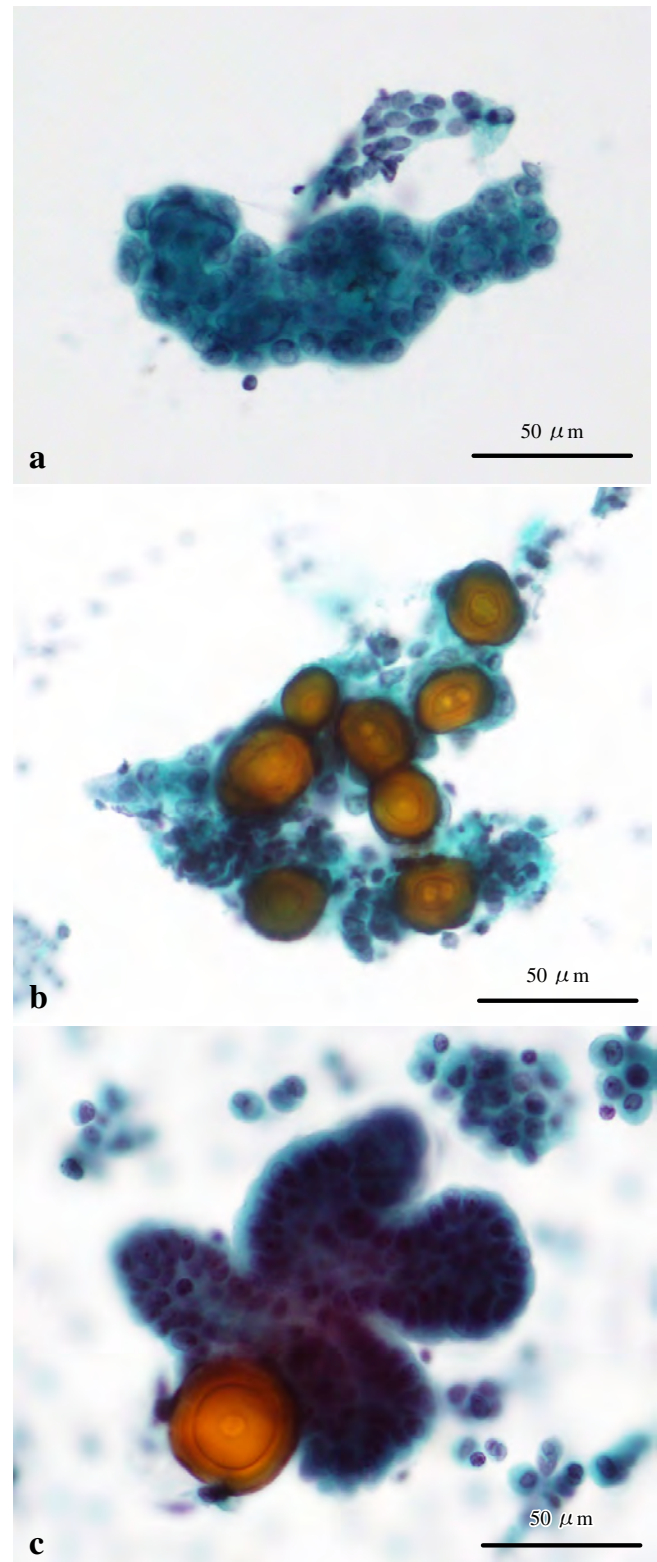


Photo. 1 Findings of endometrial cytology (a, b) and peritoneal cytology (c).

Pap. staining, a, b, c : $\times 40$.

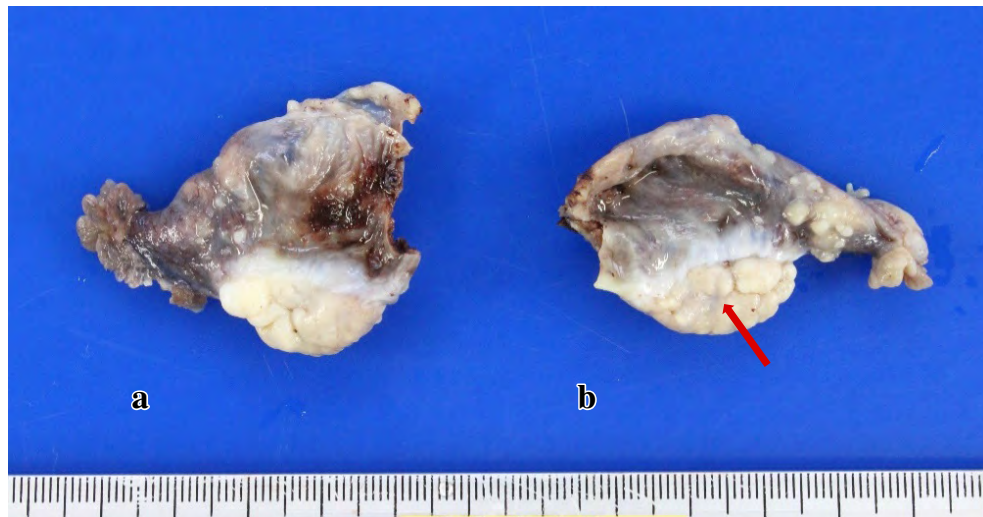


Photo. 2 Macroscopic findings of the ovaries and fallopian tubes (Red arrow : putative tumor site).
a : left, b : right.

や悪性を示唆する所見は認めなかった (Photo. 2)。

組織学的所見：両側付属器の全割による標本作製を行った。卵巣および卵管を含めて約3～5mm幅で細切し検索したが、明らかな腫瘍成分は認められなかった。その後摘出ブロック標本の深切りによる再評価を行ったところ、右卵巣のごく一部の表層に局限して砂粒体を伴う乳頭状漿液性腫瘍の所見が確認された。深部への浸潤は認められなかった (Photo. 3a)。周囲の卵巣表層上皮に比して病変部では、細胞および核の腫大や配列の乱れを認め、一部乳頭状構造を呈して増殖していた (Photo. 3b)。粘液産生は認められなかった。MIB-1 は非腫瘍性卵巣上皮核に陽性所見は認められなかったが、病変部では標識率は高い部分で10%程度であった (Photo. 3c)。以上の所見から右卵巣漿液性境界悪性腫瘍と診断した。卵管においては、漿膜側に傍卵巣嚢腫を認めたが、ほかに炎症や上皮に異型や腫瘍所見はみられなかった。

V. 考 察

卵巣腫瘍が健全な卵管を介して子宮腔内に迷入し、子宮内膜細胞診あるいは頸部細胞診で検出されることがある。このような症例の多くは、腹水貯留をきたす進行癌がほとんどである。これまでの報告によれば、卵巣癌が内膜細胞診で陽性となる頻度は12～26%で、腹腔細胞診陽性例で見ると24～73%とされている²⁻⁴⁾。すなわち、内膜細胞診陽性は腹腔細胞診陽性に大きく影響を受けることが示唆され、組織型、腹水量、病期との相関も報告されている^{2,3)}。本例では、術中に少量の腹水が認められ、その中に観察された異型細胞と内膜細胞診で捉えられた異型細胞は砂粒体

を伴い類似の所見を示していた。このことから、卵巣表層の病変から腹水中に遊離した腫瘍細胞が経卵管的に子宮内に迷入したことにより、内膜細胞診異常をきたしたと考えられる。本例のような卵巣境界悪性腫瘍での同様の症例報告は極めてまれであるが、早期発見が難しい子宮付属器腫瘍の診断における細胞診の重要性が再認識された。

子宮内膜細胞診において異常細胞が出現した場合には、子宮内膜原発腫瘍との鑑別が必要となる。卵巣由来の細胞では、腹腔内に遊離した腫瘍細胞が腹水を介して経卵管的に子宮内膜へ達するため、変性を伴い子宮内膜腫瘍に比べ小型集塊を形成すると推察されている⁵⁾。内膜転移をみない原発性卵巣癌における細胞診標本では、①背景がきれい、②出現している子宮内膜腺細胞に異型がみられない、③集塊は小型で辺縁が平滑である、などの細胞所見が挙げられている^{5,6)}。これらの所見に注目すれば、細胞診で子宮付属器や腹膜など子宮外臓器由来の悪性腫瘍を推定することはある程度可能であると考えられる。本例でも、これらの特徴が現れており、子宮外の腺癌を疑った。先述のごとく、卵巣境界悪性腫瘍の報告は極めてまれであるが、上述の①～③の判定基準は本例のような境界悪性腫瘍にも適応できる可能性がある。

本例の内膜細胞診および腹水細胞診では砂粒体の存在が特徴的であった。砂粒体は変性・壊死に陥った細胞が石灰沈着を起こし層状構造を示すもので、婦人科疾患では漿液性腫瘍に代表される腫瘍性病変のみならず子宮内膜症、卵管内膜症といった良性病変でも検出されるとされている^{7,8)}。さらに、頸部細胞診で砂粒体が出現した31例においては、悪性病変が12例、良性病変が19例であったとの報告が認められる⁸⁾。悪性病変の内訳は、卵巣癌（境界悪

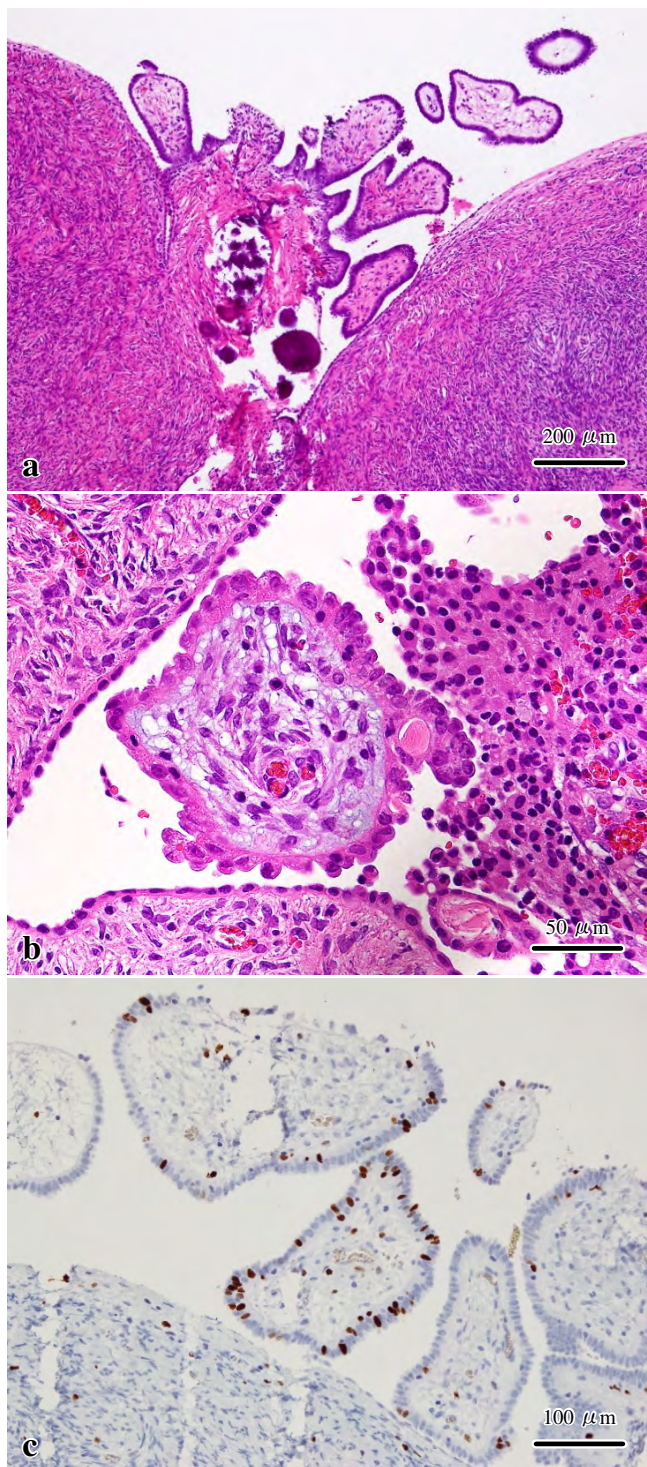


Photo. 3 Histological findings of the surface serous borderline tumor of the right ovary.
HE staining, a : $\times 10$, b : $\times 40$.
MIB-1 immunostaining, c : $\times 20$.

性腫瘍・腹膜癌を含む) 10 例, 体癌 1 例, 頸癌 1 例で, 組織型別では漿液性癌が 9 例 (境界悪性腫瘍を含む) と大半を占めていた。

漿液性腫瘍において外向性発育を呈する場合は, 境界悪性でも遊離した腫瘍細胞が多数腹腔内に出現する可能性がある⁹⁾。境界悪性腫瘍にはいくつかの固有の特徴がみられるが, その一つでもある外向性発育/表在乳頭型は, 漿液性腫瘍の 1~2 割程度にみられる特異的な発育形態であり, 腹膜インプラントや腹腔細胞診陽性となるリスクが高い傾向にある¹⁾。本例においても, 微小な病変でありながら外向性発育を呈しており, 腹膜インプラントは伴わないものの腹水細胞診陽性であった。

漿液性癌は, 高異型度漿液性癌 (high-grade serous carcinoma : HGSC) と低異型度漿液性癌 (low-grade serous carcinoma : LGSC) の 2 つに分類され, 漿液性癌の 95% を占める HGSC の核異型は高度で核分裂像が多く認められる¹⁰⁾。本例では, 細胞診において核異型が目立たないことから HGSC は否定的であり, LGSC あるいは境界悪性腫瘍と考えられたが, 細胞診による悪性度の評価には限界があるものと考えられる。

近年, 卵巣および腹膜の漿液性癌の母地が卵管上皮であるとする知見が注目されている。すなわち, 今まで卵巣漿液性癌と考えられていた腫瘍の一部, あるいは大部分が本質的には卵管癌であった可能性がある。また, 特に HGSC では漿液性卵管上皮内癌 (serous tubal intraepithelial carcinoma : STIC) が高率に観察されるとされている¹¹⁾。本例では卵管を含めた詳細な検索を行ったが, 卵巣表層のごく一部に腫瘍成分を認めるのみで卵管には異常はみられず卵巣原発と診断した。本例において, 最初に作製した両側付属器の標本では腫瘍成分はみられず, 後に作製した深切り標本により再検討した結果, 右卵巣漿液性境界悪性腫瘍の所見が確認された。Photo. 2 についてレトロスペクティブにみると, 赤矢印で示す部位に病変があったと推測されるが, 肉眼で判断することは困難であった。したがって, 肉眼で明らかな所見がなくても卵巣または卵管原発腫瘍が疑われる場合, 微小癌の可能性を考慮し全割による詳細な組織学的検索が必要と考えられる。

VI. 結 語

今回, 50 歳代の患者において無症状で子宮内膜細胞診のみ陽性であり, 診断目的に腹腔鏡下両側付属器摘出術を施行し, 卵巣境界悪性腫瘍の診断に至った症例を経験した。本例は, 腹水および子宮内膜細胞診にて砂粒体を含む類似の異型細胞が出現していたことから, 腹腔内に存在する腫瘍細胞が経卵管的に子宮腔内に迷入したと考えられた。本例のような場合には, 腫瘍細胞の由来の検索は子宮付属器から進めていくことは妥当であり, 重要であると考えられ

た。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Background : In patients with ovarian cancer, cancer cells may be found in endometrial cytology samples by transfer of tumor cells through the fallopian tube. However, there are few reports of such an occurrence in cases with ovarian borderline tumors. We report a case of ovarian serous borderline tumor diagnosed by endometrial cytology and treated by laparoscopic salpingo-oophorectomy.

Case : A woman in her 50s was admitted to our hospital for positive endometrial cytology. Endometrial cytology revealed a few atypical cell clusters with psammoma bodies among atrophic endometrial cell clusters. Transvaginal ultrasound, CT and MRI revealed no tumor in the pelvic cavity, including the uterus and ovaries. Therefore, laparoscopic salpingo-oophorectomy was performed for the purpose of diagnosis. A small amount of surrounding ascites fluid was found to contain atypical cells similar to those observed on endometrial cytology. Initially, the tumor components were not observed histologically, but after extensive microscopic examination of specimen blocks, a small surface papillary lesion, approximately 1 mm in size, was identified in the right ovary, which was diagnosed as a serous borderline tumor with psammoma bodies.

Conclusion : In some cases of ovarian serous borderline malignancy, endometrial cytology may be useful for early detection of the primary focus.

文 献

- 1) 加藤智美, 矢島沙紀, 佐瀬智子, 鎌倉靖夫, 清水道生, 今井雄一・ほか. 内膜細胞診で砂粒小体を伴う腫瘍細胞を認めた

- 卵巣漿液性境界悪性腫瘍の 1 例. 日臨細胞会誌 2015 ; 54 : 216-220.
- 2) Hirasawa, T., Yasuda, M., Muramatsu, T., Itoh, H., Shinozuka, T., Makino, T., et al. Cytologic study of ascites and the endometrium in ovarian carcinoma. Clinical significance. Acta Cytol 1997 ; 41 : 1451-1455.
- 3) Jobo, T., Arai, M., Iwaya, H., Kato, Y., Ohno, E., Kuramoto, H. Usefulness of endometrial aspiration cytology for the preoperative diagnosis of ovarian carcinoma. Acta Cytol 1999 ; 43 : 104-109.
- 4) Otsuka, I., Kameda, S., Hoshi, K. Early detection of ovarian and fallopian tube cancer by examination of cytological samples from the endometrial cavity. Br J Cancer 2013 ; 109 : 603-609.
- 5) 坂 貴司, 木下勇一, 蝶良愛郎. 子宮内膜細胞診に癌細胞が出現した卵巣癌症例の解析. 日臨細胞会誌 2013 ; 52 : 96-100.
- 6) 越野立夫, 佐々木茂, 中井章人, 横田明重, 三田俊二, 大屋敦子・ほか. 子宮内膜細胞診が陽性であった normal sized ovarian carcinoma 症例. J Nippon Med Sch 2001 ; 68 : 198-201.
- 7) Nicklin, J. L., Perrin, L., Obermair, A., McConachie, I., Cominos, D. The significance of psammoma bodies on cervical cytology smears. Gynecol Oncol 2001 ; 83 : 6-9.
- 8) Misdraji, J., Vaidya, A., Tambouret, R. H., Duska, L., Bell, D. A. Psammoma bodies in cervicovaginal cytology specimens : a clinicopathological analysis of 31 cases. Gynecol Oncol 2006 ; 103 : 238-246.
- 9) 加藤智美, 安田政実. 細胞診の実際とトピックス 3. 卵巣. 細胞診の基本から実践へ. 病理と臨 (臨時増刊号) 2013 ; 31 : 185-195.
- 10) 清川貴子. 卵巣・卵管および子宮の漿液性癌をめぐる最近の話題. 病理と臨 2016 ; 34 : 1003-1005.
- 11) 福永真治. 卵巣腫瘍Ⅱ—病理診断の実際—卵巣漿液性腺癌, 卵管癌, 腹膜原発癌の異同と鑑別. 病理と臨 2015 ; 33 : 1080-1084.

症 例

尿細胞診に胃型腺癌が出現した OHVIRA 症候群の 1 例

中澤久美子¹⁾ 大森真紀子²⁾ 望月 直子¹⁾ 花井 佑樹¹⁾
笠井 一希¹⁾ 中村 海斗¹⁾ 田中 薫¹⁾ 大石 直輝³⁾
望月 邦夫¹⁾ 近藤 哲夫^{1,3)}

山梨大学医学部附属病院病理部¹⁾, 山梨大学医学部産婦人科学講座²⁾, 同 人体病理学講座³⁾

背景：尿細胞診で胃型形質を示す腺癌が認められたまれな症例を経験したので報告する。

症例：患者は 40 歳代，女性。膀胱腫瘍による尿管閉塞から急性腎不全となり救急搬送された。MRI で膀胱腫瘍と重複子宮，重複腔，片側腔閉鎖，片側腎欠損（OHVIRA 症候群）が認められた。尿細胞診像は，壊死物を含む炎症性背景に，桃色から橙黄色調の粘液を含む異型細胞集団および細胞境界明瞭な明るい細胞質を示す立方状細胞集団がみられた。核異型は軽度で微細クロマチンの増量を認め腺癌と診断した。膀胱組織生検では，尿路上皮癌成分を認めず，鋸歯状の異型腺管が増殖，浸潤していた。免疫染色で M-GGMC-1 (HIK1083) と MUC6 が一部に陽性を示し，胃型形質を示す腺癌と診断された。

結論：尿中に細胞境界明瞭な明るい細胞質を示す核異型の乏しい腺癌が認められた場合には，胃型腺癌も鑑別に挙げて臨床所見と併せ総合的な診断を行うことが重要である。

Key words : Adenocarcinoma, Urine cytology, Gastric-type, OHVIRA syndrome, Case report

I. はじめに

膀胱にみられる腺癌は，原発および転移性ともに比較的まれで，それぞれ膀胱癌の 0.5~2%，2.3%と言われている¹⁾。膀胱腺癌には種々の亜型が存在し，さらに転移性腫瘍や周辺臓器からの浸潤もあるため，その鑑別は容易ではない。一方，OHVIRA (obstructed hemivagina ipsilateral

renal anomaly) 症候群は，Wolff 管の発生障害に伴う Müller 管の癒合不全によって生じ，重複子宮，重複腔に片側腔閉鎖，患側腎欠損を合併するまれな疾患である²⁾。今回われわれは，尿細胞診に胃型形質を示す腺癌を認め，鑑別診断に苦慮した OHVIRA 症候群の 1 例を経験したので報告する。

II. 症 例

患 者：40 歳代，女性。

主 訴：無尿

既往歴：なし

現病歴：1 ヶ月半前に，月経困難症を主訴に近医婦人科を受診した。MRI で，膀胱後壁に広範な壁肥厚を認め (Photo. 1a)，膀胱異所性内膜症が疑われた。また，重複子宮，重複腔の右腔閉鎖，右腎欠損 (Photo. 1b, c, d) を認め OHVIRA 症候群，右卵管留血症と診断された。MRI 上，左右の子宮頸部，体部に明らかな腫瘍性病変は認められなかった。左子宮頸部の細胞診（ブラシ擦過，従来法）は NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy) で，右頸部は腔閉鎖のために検査することができなかった。尿

Urinary cytologic findings of gastric-type adenocarcinoma in a case of OHVIRA syndrome

Kumiko NAKAZAWA¹⁾, C. T., I. A. C., Makiko OMORI²⁾, M. D., Naoko MOCHIZUKI¹⁾, C. T., I. A. C., Yuuki HANAI¹⁾, C. T., I. A. C., Kazuki KASAI¹⁾, C. T., I. A. C., Kaito NAKAMURA¹⁾, C. T., I. A. C., Kaoru TANAKA¹⁾, C. T., I. A. C., Naoki OISHI³⁾, M. D., Kunio MOCHIZUKI¹⁾, M. D., Tetsuo KONDO^{1,3)}, M. D., F. I. A. C.

¹⁾Department of Pathology, University of Yamanashi Hospital

²⁾Department of Gynecology, ³⁾Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi

論文別刷請求先 〒 409-3898 山梨県中央市下河東 1110 山梨大学医学部附属病院病理部 中澤久美子

令和 2 年 8 月 17 日受付

令和 2 年 9 月 3 日受理

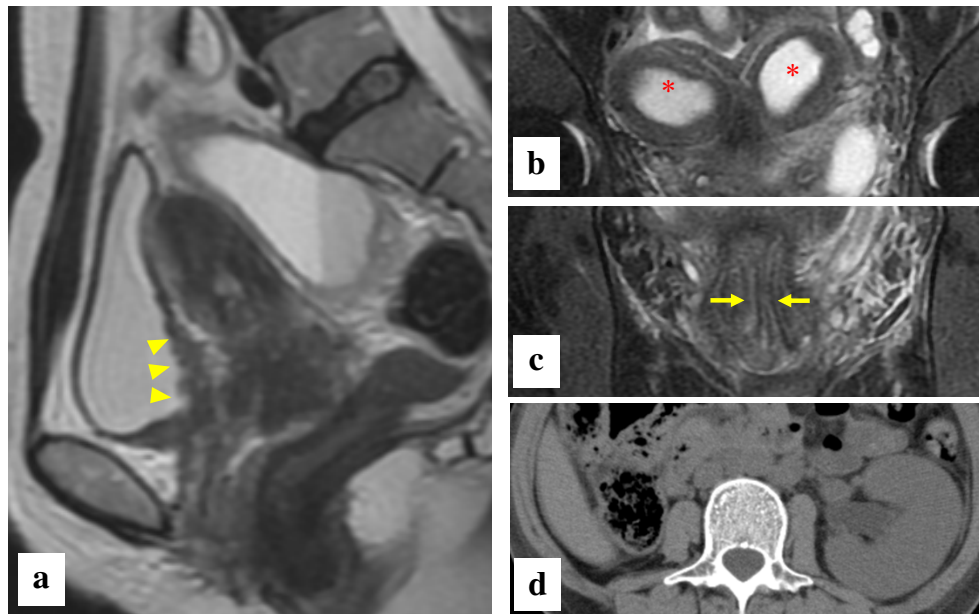


Photo. 1 Magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) findings on admission.
 a : Sagittal T2-weighted MRI of the pelvis demonstrates irregular thickening of the posterior wall of the bladder (arrowheads).
 b, c : Coronal MRI shows uterus didelphys consisting of a double uterine body (b, asterisks) and two separated cervixes (c, arrows). There is no evidence of abnormal findings in the uterus.
 d : Abdominal CT image shows a right kidney defect.

Table 1 Cytological and histological diagnoses

Date of examination	Sample	Diagnosis
y-1/Dec/d (another clinic)	Uterine cervix*	NILM
y/Feb/d (our hospital)	Urinary bladder, biopsy and TURBT	adenocarcinoma
y/May/d	Uterine cervix*	adenocarcinoma
y/May/d + 7	Uterine cervix*	adenocarcinoma
	Uterine cervix, biopsy	adenocarcinoma
y/May/d + 14	Bladder wash	adenocarcinoma suspected
y/May/d + 19	Ascites, laparoscopy	adenocarcinoma
y/Jul/d	Uterine cervix*	adenocarcinoma
y/Aug/d	Catheterized urine	adenocarcinoma
y/Nov/d	Urinary bladder, biopsy and TURBT	adenocarcinoma
	Vaginal wall*	adenocarcinoma
	Catheterized urine	degenerated cells
y + 1/Apr/d	Uterine cervix*	NILM

*Conventional method

検査に異常はみられなかった。

今回、4 日前から尿量が減少したため近医を受診し、尿管閉塞による腎後性腎不全にて当院に救急搬送された。直ちに経尿道的尿管ステント留置および経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT : transurethral resection of the bladder tumor) が施行され、病理組織診断で膀胱腺癌と診断された。膀胱摘出術が予定されたが、術前の左子宮頸部細胞診

および生検で腺癌が検出されたため、膀胱摘出術は中止され、左尿管皮膚瘻造設、腹腔鏡検査および腹水採取が行われた。原発巣の確定は困難であったが、膀胱に大きな腫瘍が認められたことより、浸潤性膀胱癌、臨床病期Ⅲ期 (T4aN0M0) と診断し、泌尿器科の管理の下、化学療法が行われた。初診から 30 ヶ月経過し、腫瘍の縮小と腫瘍マーカー (CA19-9) の低下を認めている。

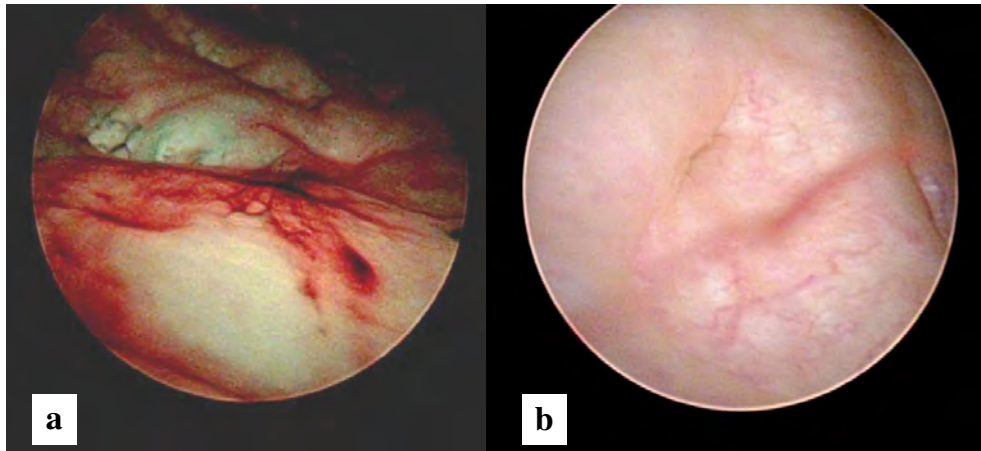


Photo. 2 Cystoscopic findings on admission.

a : Cystoscopic examination shows an irregular mucosa with hemorrhage near the left ureteral orifice.

b : Edematous irregular mucosa on the bladder neck to its left.

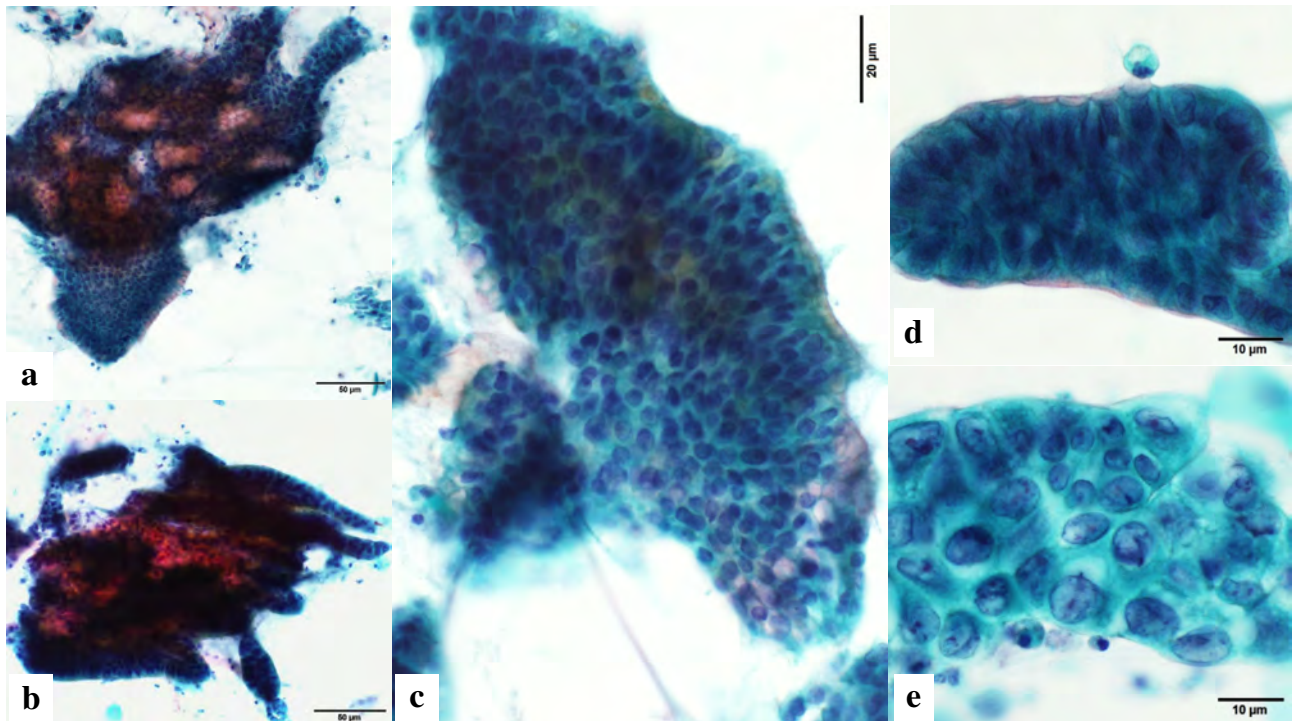


Photo. 3 Cytologic findings of the uterine cervix.

a : Cervical smear shows a large cell cluster with a cribriform pattern ($\times 20$). b : A large cell cluster showing a serrated morphology ($\times 20$). c : Dense clusters of atypical glandular cells containing yellowish mucin ($\times 40$). d : A group of cells with slight mucus on the surface of the cluster ($\times 60$). e : A group of cells showing high nuclear atypia and scant mucin ($\times 60$) (a-e, Papanicolaou staining).

その間に行われた細胞診および病理診断経過を Table 1 に示す.

初診時膀胱鏡所見：左側尿管口付近に出血を伴う不整粘膜がみられ，膀胱頸部から左側壁にかけて浮腫を伴う不整粘膜の広がりを認めた (Photo. 2).

III. 細胞学的所見

子宮頸部細胞診 (ブラシ擦過，従来法) : Table 1 に示すように，近医初診時の左子宮頸部細胞診は NILM で異常を

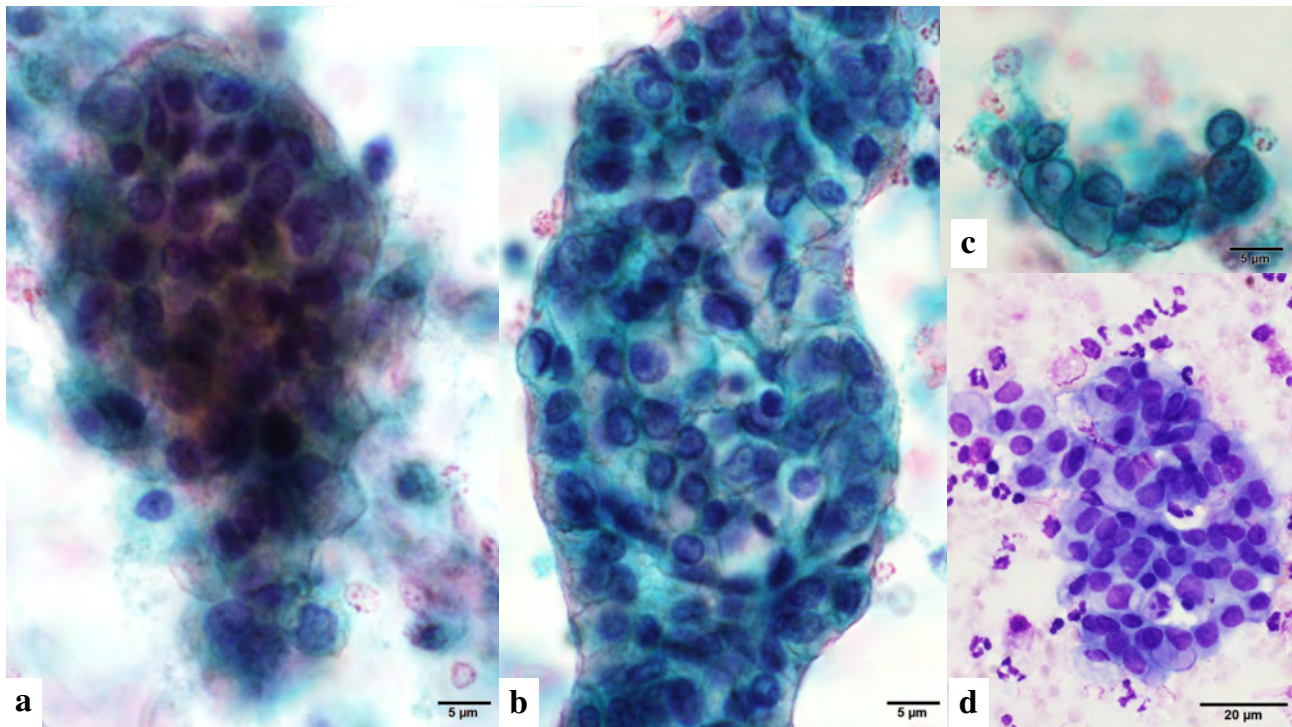


Photo. 4 Cytologic findings of a bladder wash sample.

a : A cell cluster containing orange-yellowish mucin seen in a markedly inflammatory background ($\times 60$). b : A cell cluster showing irregular arrangement and pink to orange mucin on the apical surface ($\times 60$). c : A cluster of cuboidal cells with clear cytoplasm and distinct cell borders ($\times 60$) (a-c Papanicolaou staining). d : Tumor cell nuclei show round-shape and fine chromatin ($\times 40$, Giemsa staining).

Table 2 Immunostaining results

Antibody	Clone	Urinary bladder	Uterine cervix
CK7	OV-TL 12/30	(+)	(+)
CK20	Ks 20.8	(+)	(+, focal)
ER	SP-1	(-)	(-)
p63	4A4	(-)	(-)
GATA3	L50-823	(-)	(-)
p53	DO-7	(+, wild type)	(+, wild type)
p16	E6H4	(-)	(-)
CDX-2	EPR2764Y	(+, focal)	(+, focal)
β -catenin	β -catenin-1	(+, cell membrane)	N/A
M-GGMC-1	HIK1083	(+, focal)	(-)
MUC6	CHL5	(+, focal)	(+, focal)
PAX8	Poly	(+ weak, focal)	(+ weak, focal)

+ : positive, - : negative, N/A : Not available

Device : VENTANA BenchMark ULTRA

認めなかった。当院で行われた細胞診では、癒合腺管を思わせる篩状集団や鋸歯状集団がみられ、細胞質には橙色調の粘液を有していた。一部では、黄色調粘液を有する異型腺細胞集団がみられた。また、集塊辺縁にわずかに粘液を有する集団や粘液がみられない核異型の強い集団が認められた (Photo. 3)。

尿細胞診 (膀胱洗浄尿) : 強い炎症性背景に、橙黄色調粘液を有する小型細胞集団がみられた。また、集塊辺縁に桃～橙色調粘液がみられる核密度の高い集団や細胞境界が明瞭な明るい細胞質を示す立方状細胞集団が認められた。核は軽度腫大し小型均一な類円形で、核偏在傾向や微細クロマチンの増量を認めた (Photo. 4)。

腹水細胞診 : 炎症細胞を背景に、粘液を有した異型細胞の大小さまざまな集団が認められた。尿細胞診および子宮頸部細胞診と同様の異型腺細胞集団であった。

IV. 組織学的所見

膀胱生検および TURBT : 尿路上皮と連続、混在して高円柱状異型細胞が鋸歯状構造を形成し増殖浸潤していた。得られた組織内に尿路上皮癌はみられなかった。免疫染色は Table 2 に示す通りで、CK7 (+), CK20 (+), ER (-), p63 (-), GATA3 (-), CDX-2 (+, focal), β -catenin (+, cell membrane), M-GGMC-1 (HIK1083) (+, focal), MUC6 (+, focal) であり、胃型形質を有する腺癌と診断された (Photo. 5)。

子宮頸部生検 : 間質に鋸歯状の異型腺管を形成する高分

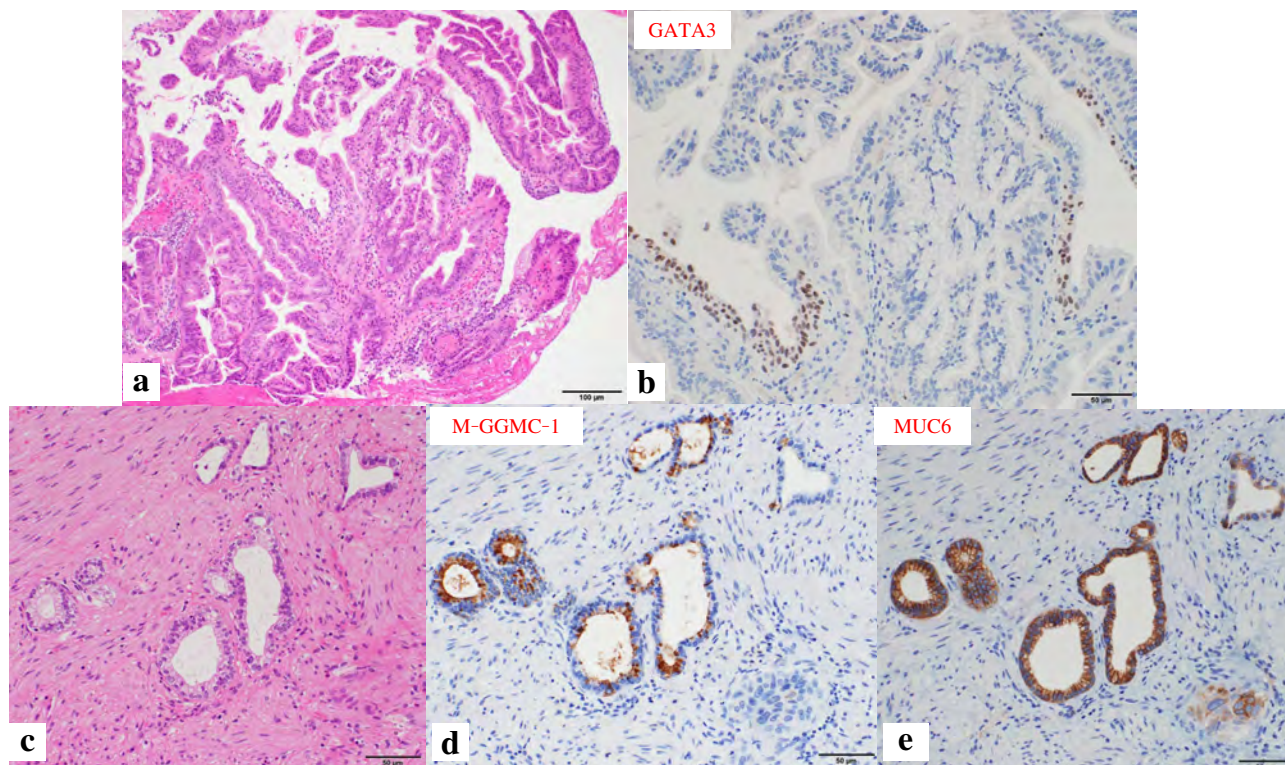


Photo. 5 Histological findings.

Urinary bladder, biopsy and TURBT : There shown the adenocarcinoma that forms a serrated atypical duct with proliferation and invasion (a, H&E staining, $\times 10$) (b, immunostaining for GATA3, $\times 20$). Gastric differentiation is suggested by the positive staining for M-GGMC-1 (d) and MUC6 (e) of a part of the infiltrating tumor (c, H&E staining) (c-e, $\times 20$).

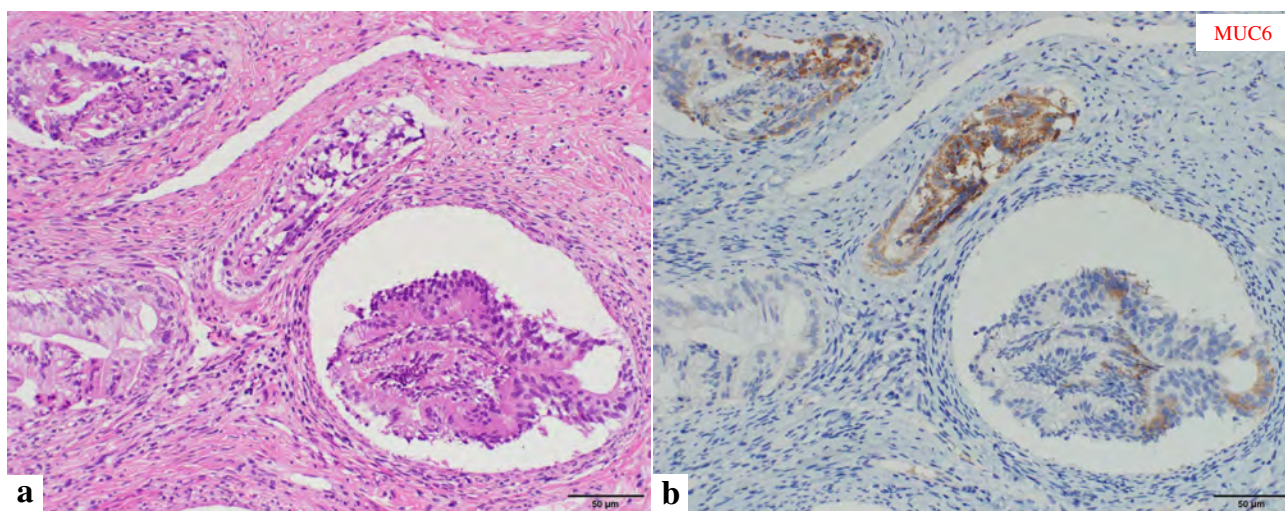


Photo. 6 Histological findings.

a : It showed invasive well-differentiated adenocarcinoma of the uterine cervix (H&E staining, $\times 20$). b : MUC6-positive staining is observed in a part, suggestive of gastric-type differentiation (immunostaining, $\times 20$).

化な腺癌の増殖がみられた (Photo. 6).

免疫染色は, CK7 (+), CK20 (+, focal), p16 (-), CDX-2 (+, focal), p53 (+, wild type), M-GGMC-1 (-), MUC6 (+, focal) であった. この結果より, 膀胱検体に

みられる腺癌と形態, 免疫形質が共通しており同一病変と考えた.

Table 3 Summary of cytological findings

	Urine	Uterine cervix	Ascites
Background	necrosis marked inflammation	necrosis	inflammation
Cell clumps	small glandular	serrated cribriform glandular	irregular glandular
Cells	cuboidal	columnar to cuboidal	columnar to cuboidal
Cytoplasm	fine foamy distinct cell borders clear (partly) apical mucus	fine foamy clear (partly) apical mucus	fine foamy vacuolization clear (partly) apical mucus
Mucus color	pink to orange yellow-brown	pink to orange yellow	pink to orange
Nuclear	small uniform round shape	small uniform round shape irregular shape	small uniform round shape mildly irregular shape
Chromatin	fine mildly hyperchromatic	fine mildly hyperchromatic	fine mildly hyperchromatic

V. 考 察

子宮頸部の胃型粘液性癌は胃型粘液を有し、ハイリスク HPV (human papillomavirus) が関連しない予後不良な腺癌として知られている³⁻⁶⁾。病理組織所見は、豊富で淡明ないしは好酸性の細胞質を有する円柱細胞で構成され、細胞境界が明瞭である。免疫染色では、M-GGMC-1, MUC6 が陽性を示し、通常型腺癌で高率に陽性となる p16 は陰性などの特徴がある。発生母地として分葉状頸管腺過形成 lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) あるいは幽門腺化生が考えられている。

細胞像は、病理組織像を反映して円柱から立方状の細胞が鋸歯状集塊や腺管状集塊を形成し、部分的に黄色から橙黄色調の粘液を有するが、ときに桃色、橙色、黄色の粘液が混在したカラフルな色調 (varicolor) を呈する⁶⁾。また、集塊の辺縁に粘液が移動した所見や粘液を持たない集塊もみられる。核異型は比較的乏しいため、細胞診断に苦慮することも多い。

本例の細胞像は Table 3 に示す通りで、尿、子宮頸部および腹水より異型腺細胞集団が認められた。すべてに共通する所見としては、微細で部分的に明るい細胞質、細胞辺縁粘液、橙色調粘液、小型・均一核で核異型が乏しいことであった。これまで、尿中に胃型形質を有する腺癌が認められた症例の報告はないが、今回の結果より尿細胞診における胃型形質を示す腺癌の特徴として、①橙黄色調粘液、②集団辺縁の粘液、③淡明な細胞質および明瞭な細胞境

界、④小型均一な立方状細胞、⑤乏しい核異型が挙げられる。

一般に尿細胞診における腺癌の診断においては、尿膜管由来腺癌、非尿膜管由来の腺癌、転移性腺癌、腺系分化を示す尿路上皮癌および集合管癌などとの鑑別が必要である。本例の場合、腫瘍の発生部位が頸部から三角部であり、頂部に発生する尿膜管由来腺癌は否定できた。また、尿路上皮癌がみられないことから腺分化を示す尿路上皮癌も除外でき、さらに核の長径が 7μ 以下の小型均一で核異型が乏しい点で、高度核異型のみられる集合管癌とは鑑別可能であった。残る鑑別は、非尿膜管由来の膀胱腺癌か転移性腺癌かである。本例は膀胱腫瘍細胞に胃型形質を認め、子宮頸部にも同様の腫瘍を認めたため、膀胱原発か子宮頸部腺癌からの直接浸潤かの鑑別が、以下の通り問題となった。①MRI 検査では子宮に腫瘍を疑う所見は認められず、膀胱に大きな腫瘍がみられた。②腫瘍の主座が膀胱頸部、三角部および左側壁にあり、非尿膜管性の膀胱原発腺癌としても矛盾しない。③膀胱癌に特徴的な GATA3 と子宮頸癌に特徴的な p16 がどちらも陰性であった。しかし、膀胱腺癌では GATA3 は陰性例も多く⁷⁾、子宮頸部の胃型腺癌では p16 は通常陰性となるため、どちらも原発である可能性が否定できない。④OHVIRA 症候群による右腔閉鎖があり、手術も施行していないため子宮の詳細な観察ができていない。⑤子宮頸部の胃型腺癌では MRI で子宮頸部に腫瘍像が明瞭に検出できない症例もある。以上の点から、最終的に腫瘍が膀胱由来か子宮由来かの鑑別は困難であった。

本例は、子宮および腎尿路に奇形がみられる OHVIRA 症候群である。本症候群では子宮に明細胞癌や類内膜癌が発

生した症例の報告はあるが^{8,9)}、われわれが調べた限りでは胃型腺癌の報告はこれまでになく、子宮原発の場合はきわめてまれな症例といえる。

また、膀胱原発の胃型腺癌も、われわれが調べた限りではこれまでに報告がない。しかし、Stojnev ら¹⁰⁾は膀胱尿路上皮癌において MUC6 の発現を 21.9% に認めており、われわれは本例を除く膀胱原発腺癌の自験例 4 例中 2 例に MUC6 陽性所見を認めている。これまで膀胱癌における胃型形質の発現についてはあまり注目されてこなかったが、胃型形質を示す膀胱腺癌もそれほどまれでない可能性がある。また、Stojnev らは尿路上皮癌で MUC6 陽性は予後良好の因子として報告しているが、膀胱腺癌における胃型形質の発現は、予後不良な子宮頸部の胃型腺癌とは異なる意味を有する可能性が考えられる。本例は臨床的には膀胱原発の腺癌としたが、残念ながら手術による組織学的確認ができていない。

今後、尿路系腫瘍においても胃型形質の発現を慎重に検討し、尿路上皮癌や膀胱由来腺癌における胃型形質の発現について、形態的特徴のみならず予後も含めて明らかにしていくことは重要であると思われる。

VI. 結 語

今回、尿細胞診に出現した胃型形質を有する腺癌の細胞所見を初めて報告した。尿細胞診において、黄橙色調の粘液を有し細胞境界明瞭な明るい細胞質で、核異型が軽度な異型腺細胞がみられた場合、胃型腺癌を鑑別のひとつに挙げる必要がある。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Background : We report the urinary cytologic findings of a case of adenocarcinoma exhibiting gastric differentiation.

Case : A 40-year-old woman presented with postrenal acute renal failure and was diagnosed by magnetic resonance imaging as having a tumor of the posterior wall of the bladder, in addition to the OHVIRA (obstructed hemivagina and ipsilateral renal anomaly) syndrome. Urinary cytology showed mildly overlapping clusters of atypical glandular cells in an inflammatory background. Cell clusters with orange to yellowish intracytoplasmic mucin, cell clusters with pinkish to orange mucin on the apical surface, and small clusters of cuboidal cells with distinct cell borders and clear cytoplasm were identified. Cervical cytology showed the same cytologic findings, although the imaging tests showed no evidence of uterine tumor. Histological examination of the bladder tumor showed invasive adenocarcinoma exhibiting a serrated

appearance, but no component of urothelial carcinoma. On immunohistochemistry, the tumor cells were focally positive for M-GGMC-1 and MUC6. Based on the findings, the tumor was diagnosed as adenocarcinoma of the bladder exhibiting gastric differentiation.

Conclusion : When mildly overlapping clusters of glandular cells with distinct cell borders, clear cytoplasm, and bland nuclei are identified on urinary cytology, gastric-type adenocarcinoma should be considered in the differential diagnosis.

文 献

- 1) Grignon, D. J., Cheville, J., Ro, J. Y., Tamboli, P. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System Male Genital Organs. Lyon : IARC Press : 2016.
- 2) Smith, N. A., Laufer, M. R. Obstructed hemivagina and ipsilateral renal anomaly (OHVIRA) syndrome : management and follow-up. Fertil Steril 2007 ; 87 : 918-922.
- 3) Tsuji, T., Togami, S., Nomoto, M., Higashi, M., Fukukura, Y., Kamio, M., et al. Uterine cervical carcinomas associated with lobular endocervical glandular hyperplasia. Histopathology 2011 ; 59 : 55-62.
- 4) Nishio, S., Mikami, Y., Tokunaga, H., Yaegashi, N., Satoh, T., Saito, M., et al. Analysis of gastric-type mucinous carcinoma of the uterine cervix—An aggressive tumor with a poor prognosis : A multi-institutional study. Gynecologic Oncology 2019 ; 153 : 13-19.
- 5) Omori, M., Kondo, T., Nakazawa, K., Tagaya, H., Ohgi, M., Fukasawa, H., et al. Interpretation of endocervical cells with gastric-type mucin on pap smears. Am J Clin Pathol 2018 ; 150 : 259-266.
- 6) Omori, M., Kondo, T., Nakazawa, K., Shinohara, S., Watanabe, Y., Fukasawa, H., et al. A case of endocervical minimal deviation adenocarcinoma with varicolored cytopathologic features on Pap smear. Diagn Cytopathol 2018 ; 46 : 702-706.
- 7) Ellis, C. L., Chang, A. G., Cimino-Mathews, A., Argani, P., Youssef, R. F., Kapur, P., et al. GATA3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of adenocarcinoma of the urinary bladder. Am J Surg Pathol 2013 ; 37 : 1756-1760.
- 8) Kosunoki, S., Huang, K-G., Magno, A. Laparoscopic en bloc resection of a para-cervical cancer with OHVIRA syndrome. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology 2018 ; 57 : 141-143.
- 9) Zung, L., Wang, W., He, Y., Cheng, N., Xiang, Y. Carcinoma of the lower female genital tract in patients with genitourinary malformations : a clinicopathologic analysis of 36 cases. J Clin Oncol 2019 ; 37 : 3054-3061.
- 10) Stojnev, S., Rstic-Petrovic, A., Velickovic, J., Krstic, M., Bogdanovic, D., Khanh, T., et al. Prognostic significance of mucin expression in urothelial bladder cancer. Int J Clin Exp Pathol 2014 ; 7 : 4945-4958.

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.jscs.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://jjssc.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, 同住所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 衡	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	草刈 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	渋谷 秀美	澁谷 潔	渋谷 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	園田顕三	駄阿 勉	多比良朋希	高倉 聡
高瀬頼妃	高田恭臣	高野忠夫	高野浩邦	高野政志	高橋 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	秀島克己	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
山田隆人	山田麻里沙	山田恭輔	山田鉄也	山田範幸	山元英崇
山本晃彦	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)

令和三年三月二十二日発行

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

〒100-0061 東京都千代田区神田駿河台二丁目一
番一
発行所 公益社団法人 日本臨床細胞学会
駿河台サンライズビル三階
電話 〇三(五五七七)四六八〇 振替 〇〇一〇一〇一三三五四五