

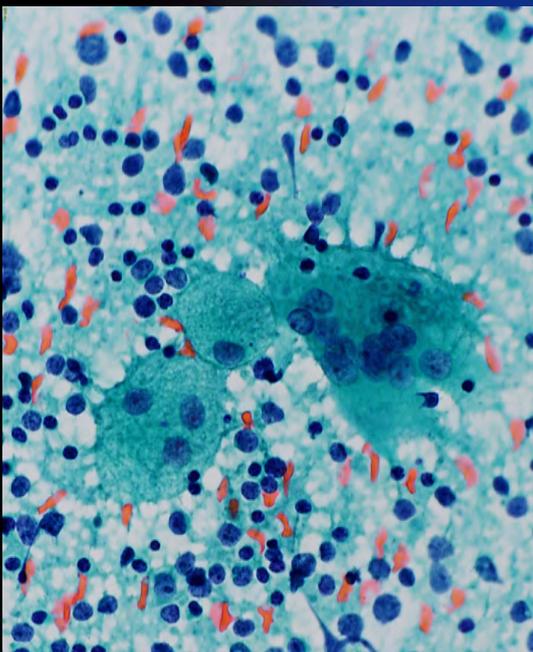
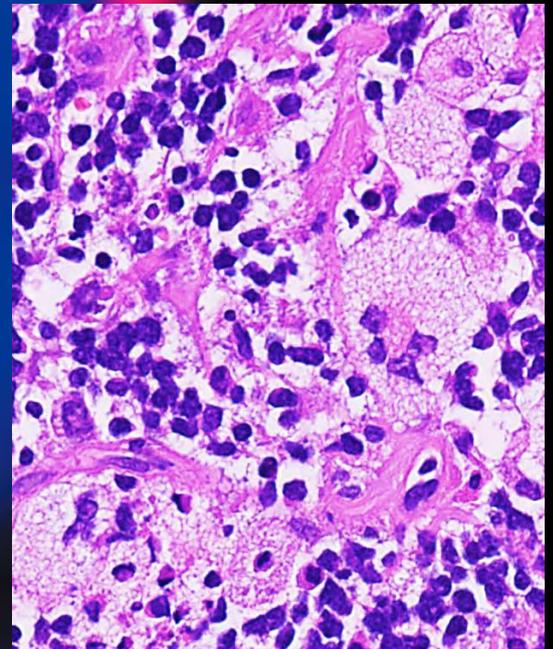
ONLINE ISSN 1882-7233  
PRINT ISSN 0387-1193

日臨細胞誌  
J.Jpn.Soc.Clin.Cytol.

第61卷 第2号 令和4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.61 No. **2**  
Mar. 2022



目 次

巻頭言.....都築 豊徳

〈原 著〉

- 複数回連続膀胱液細胞診における核の偏在傾向を示す類円形細胞の検討  
.....JA 広島厚生連尾道総合病院病理研究検査科 佐々木健司・他 (93)
- 子宮頸部細胞診に出現するクラミジア封入体細胞の特異性——クラミジア核酸増幅検査に基づく検証——  
.....医療法人社団高邦会高木病院検査技術部 山口沙由莉・他 (98)
- 体腔液細胞診の膀胱癌細胞における上皮間葉転換癌細胞の細胞形態  
.....久留米大学病院病理診断科・病理部 村田 和也・他 (107)

〈症 例〉

- 多核巨細胞を多数認めたびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の 1 例  
.....国立大学法人神戸大学医学部附属病院病理部 吉田 美帆・他 (116)
- 肉腫成分を含んだ肺の混合型小細胞癌の 1 例  
.....地方独立行政法人栃木県立がんセンター検査技術科 上田 香織・他 (122)
- 前立腺癌の内分泌療法中に尿中に腫瘍細胞が出現した前立腺小細胞癌の 1 例  
.....東邦大学医療センター大橋病院病院病理部/病理診断科 中村 千秋・他 (129)
- 髄液中にメラニン色素を含有する異型細胞を認めた小児の髄膜黒色腫症の 1 例  
.....沖縄県立南部医療センター・こども医療センター病理診断科 南部 順一・他 (136)
- 細胞転写法を用いた免疫染色が原発巣の推定に有用であった頸部リンパ節転移癌の 1 例  
.....春日井市民病院臨床検査技術室 渡邊 弥生・他 (141)

投稿規定.....(147)

編集委員会.....(157)

＊

〈表紙写真〉

多核巨細胞を多数認めたびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫

(左：パパンニコロウ染色，右：H-E 染色) (吉田美帆・他，左：Photo. 4，右：Photo. 5b，ともに 118 頁)

## CONTENTS

Editorial.....Toyonori Tsuzuki

### Original Articles

The diagnostic significance of round cells with a tendency toward nuclear eccentricity in serial pancreatic juice aspiration cytology examinations

Kenji Sasaki, et al. (Dept. of Path., JA Onomichi General Hosp., Hiroshima) .....( 93 )

Specificity of intracytoplasmic inclusions appearing in uterine cervical cytology for *chlamydia trachomatis* genital infection  
—Inspection based on the *chlamydia trachomatis* nucleic acid amplification test—

Sayuri Yamaguchi, et al. (Dept. of Clin. Lab., Takagi Hosp., Fukuoka) .....( 98 )

Cytological features of epithelial-mesenchymal transition cells in effusion cytology in cases of pancreatic cancer

Kazuya Murata, et al. (Dept. of Diag. Path., Kurume Univ. Hosp., Fukuoka) .....(107)

### Clinical Articles

A case of diffuse large B-cell lymphoma with a large number of multinucleated giant cells

Miho Yoshida-Tanaka, et al. (Dept. of Path., Kobe Univ. Hosp., Hyogo) .....(116)

A case of combined small cell carcinoma of the lung with carcinosarcoma

Kaori Ueta, et al. (Div. of Clin. Lab., Tochigi Cancer Center, Tochigi) .....(122)

Small cell carcinoma of the prostate—A case report, with a review of the literature—

Chiaki Nakamura, et al. (Dept. of Path., Toho Univ. Ohashi Med. Center, Tokyo) .....(129)

Pediatric meningeal melanomatosis with the presence of atypical melanocytic cells in the cerebrospinal fluid

—A case report—

Junichi Nambu, et al. (Dept. of Diag. Path., Okinawa Pref. Nanbu Med. Center & Children's Med. Center, Okinawa)  
.....(136)

A case of cervical lymph node metastasis in which the primary lesion was identified by immunostaining using the cell transfer technique

Yayoi Watanabe, et al. (Dept. of Clin. Lab. Med., Kasugai Municipal Hosp., Aichi) .....(141)

Notice to contributors.....(147)

### Cover Photo

Diffuse large B-cell lymphoma with a large number of multinucleated giant cells

(Left : Pap. stain, Right : H-E stain) (Miho Yoshida-Tanaka, et al., Left : Photo. 4, Right : Photo. 5b, p118)



## 巻頭言

Toyonori Tsuzuki

# 都築豊徳

愛知医科大学病院病理診断科教授

### ▶ ポストコロナ後の学会発表について



新型コロナウイルス感染が蔓延する状況下となり、多くの学会がWEB形式で行われている。この傾向は全国学会のみならず、地方会レベルまでその影響は広く及んでいる。WEB形式発表による現在の学会の抱える問題点を、学会発表の観点から論じてみたい。

WEB形式での学会が開催されるようになった当初は、ほとんどの学会は暗中模索の状態、学会毎にかなり創意工夫をされていた。試行錯誤の結果、おおよその規範となるモデルが出来上がり、それに沿って多くの学会が開催されていると思われる。WEB形式での学会の利点は様々挙げられる。主なものとしては、開催場所や日程に左右されずに参加できること、日常業務に支障を来すことが少ないこと、魅力ある発表が時間的に重複していても聴取出来ること、金銭的に旅費が節約できることなどが挙げられる。運営方法が成熟してきている現在ではWEB形式による学会開催の良いことばかりに見えているのが現状ではないかと思われる。それを反映してか、今後の学会開催は全てWEB形式で行いたいとの極論も出てきている。

しかしながら、WEB形式での学会開催にも影が存在し、それが顕在化してきている。その一つが学会発表の活気である。新型コロナウイルス感染が蔓延する前は、個人の学会発表は花形であり、多くの演者は緊張していた。そこに様々な質問がなされ、それに対する討議を経て、演者が成長していく状況を何度も見たものである。しかしながら、シンポジウムやワークショップでは以前と変わらぬ盛り上がりを見せているのであるが、個々の発表となると閑散とした状況である。実際に様々な学会の発表会場には誰も“存在”せず、只むなしくポスターが貼られているだけである。電子発表形式にしても、ほとんど演者への質問の書き込みはなく、演者にとっての成長の場が見られない状況である。筆者は日本臨床細胞学会細胞検査士試験並びに教育に関する事に携わっており、最近の地方会の内容を全て見る機会がある。その内容を見ると、講演会が主体で学会会員による発表数が少ない状況になっている。この傾向がいつから強まったのかは定かではないが、筆者の印象では以前の地方会ではそれぞれの地方会の会員の発表が主体であったような気がする。WEB形式での発表の難点は演者の顔が見えにくい、それ故に質問がしにくいことが挙げられる。また、質問のタイミングが取りにくいのも大きな問題点である。現地開催であれば、座長やそのほかの関係者が色々な配慮をして、討議が活発になるもしくは質問に窮す



る演者を支えてきていた。しかしながら、WEB形式での発表ではこれらの振る舞いが難しいのが現状であると思われる。WEB形式での発表は概ね低調であるのが現状だと筆者は感じているのだが、上述の理由が大きく影響しているのではないかと感じている。

現在、日本臨床細胞学会雑誌への投稿数が減少した状況で、その編集に御苦労されている話を伺うことが多い。その原因の一つとして、会員全体の学術論文投稿への意欲が減退していることが指摘されている。邦文論文の投稿が減少しているのみではなく、英文誌への投稿数も減少しているのが日本の現状である。残念なことであるが、日本全体として自らの研究成果を発表する意欲が減衰してきている状況である。その一方では、教育講演などの実利的な講義形式の発表会場は盛況であったし、WEB形式になっても上記の講演は非常に人気が高いと聞く。また、e-learningも盛んに行われ、非常に大きな成果を上げている。これらのことは情報が豊富になったことにより多くの有用な知識が得やすくなったことを反映していると思う。その反面、自らの努力と経験から創意工夫を行った結果を発表することを忌避しているように見える。特に、討論で反論を受けると、自らの発表が否定されたような気分になる傾向が強くなり、その結果としてそれ以降の研究発表を避ける傾向があるような印象を受けている。真の意味の知識とはヒトから学ぶものではなく自分で獲得するものではないかと筆者は考えている。そのことから、貴重な発表の場が隅に追いやられてしまう現状は大きく憂えるべきと考える次第である。

新型コロナウイルス感染蔓延によるWEB形式による学会開催がこの傾向をより助長したのではと著者は考えている。ポストコロナの対応が話題に挙げられるが、学会開催（全国学会及び地方会とも）のあり方も大きな問題である。筆者が特に憂慮すべきと考えるのは口演並びにポスター発表のあり方である。現地参加が可能になった時に、かつてのような活気ある討論の場が戻ってくるのが心配である。現状では活性化するための妙案を持ち合わせていないが、そろそろポストコロナを見据えた学会のあり方を検討する時期に来ていると筆者は考えている。早い段階で学会発表を活性化しないと、現状の異常な状態が“正常”と誤認されたままになることを危惧するからである（特に新型コロナウイルス感染蔓延後の学会しか経験したことがない世代）。WEB形式による発表でも活性化は出来るのかもしれないが、やはり活気ある討論は現場での対話からでないと生まれてこないのではないかと考えるのは筆者のみではないと思う。

米国の生物学者レイチェル カーソンは、農薬の被害が生態系に及ぼす影響を“沈黙の春”と題した有名な書物を発表している。この本の内容を御存知ない方も見えるかと思うのでその趣旨を要約すると、農薬の過剰使用によって、生態系が完全に破壊されたことにより動物が死滅し、春を迎えても鳥のさえずりなどの動物の声がない“沈黙（無音）の春”を迎える可能性を比喩したのがこの本のタイトルの由来である。新型コロナウイルス感染蔓延によるWEB形式の学会発表が“沈黙の学会”をもたらさないことを祈るばかりである。その為にも、学会会員個々が努力を重ねていく必要があると考える。

## 原 著

複数回連続膵液細胞診における核の偏在傾向を示す  
類円形細胞の検討佐々木健司 中嶋 愛海 羽原 幸輝 神田 真規  
米原 修治

JA 広島厚生連尾道総合病院病理研究検査科

目的：複数回連続膵液細胞診における核の偏在傾向を示す類円形細胞の診断的意義について検討した。

方法：高異型度膵上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia : PanIN) 12 例を検討対象とした。細胞診標本を鏡検し、核の偏在傾向を示す類円形細胞の出現率と出現細胞数、出現様式を検討し、それらの細胞の核形不整、クロマチンの増量や不均等分布、クロマチンの多彩性、核小体について観察した。対照として慢性膵炎 13 例の細胞診標本を用いて同様に検討した。

成績：核の偏在傾向を示す類円形細胞の出現率は高異型度 PanIN では 12 例中 10 例 (83%)、慢性膵炎は 13 例中 4 例 (31%) であった。高異型度 PanIN では中程度数から多数出現しており、核形不整やクロマチンの異常がみられた。慢性膵炎では、核の偏在傾向を示す類円形細胞は少なく、クロマチンの不均等分布と多彩性を示す症例は認められなかった。

結論：核の偏在傾向を示す類円形細胞におけるクロマチンの不均等分布と多彩性の所見は、悪性判定の手助けとなりうる可能性がある。

**Key words** : Pancreas, Serial pancreatic juice aspiration cytologic examination, Round cell, High-grade pancreatic intraepithelial neoplasia

## I. はじめに

すでに 30 年ほど前から内視鏡的逆行性胆管膵管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography : ERCP) 膵液細胞診による上皮内癌診断の症例報告や上皮内癌を含

む早期膵腫瘍のまとまった報告があり、早期膵癌診断における膵液細胞診の有用性が指摘されている<sup>1)</sup>。また、近年では内視鏡的経鼻膵管ドレナージ (endoscopic nasopancreatic drainage : ENPD) 留置下膵液を用いた細胞診の有用性についての報告が複数認められる<sup>2-4)</sup>。この手法は複数回連続膵液細胞診 (serial pancreatic juice aspiration cytologic examination : SPACE) と命名され、上皮内癌の診断法として広く注目されるようになった<sup>5,6)</sup>。しかし、これらの報告は細胞所見の記載に乏しく、SPACE における膵上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia : PanIN) の細胞学的判定基準については確立されているとはいいがたい<sup>2-6)</sup>。一方、ERCP 時に採取された膵液では細胞学的判定基準が報告されており、核の偏在傾向を示す類円形細胞の悪性判定における有用性が示されている<sup>7-9)</sup>。そこで、SPACE における核の偏在傾向を示す類円形細胞の診断的意義を明らかにすることを目的として SPACE 標本を検討

The diagnostic significance of round cells with a tendency toward nuclear eccentricity in serial pancreatic juice aspiration cytology examinations

Kenji SASAKI, C. T., I. A. C., Manami NAKASHIMA, C. T., J. S. C., Koki HABARA, C. T., J. S. C., Masanori KODA, C. T., I. A. C., Shuji YONEHARA, M. D.

Department of Pathology, JA Onomichi General Hospital  
論文別刷請求先 〒722-8508 広島県尾道市平原 1 の 10 の 23 JA  
広島厚生連尾道総合病院病理研究検査科 佐々木健司  
令和 3 年 4 月 8 日受付  
令和 3 年 5 月 17 日受理

**Table 1** Detection rate of round cells with a tendency toward nuclear eccentricity

	HGPanIN (n = 12) % (number)	CP (n = 13) % (number)
Round cells with eccentric nuclei	83 (10)	31 (4)
No round cells	17 (2)	69 (9)

p = 0.015

HGPanIN : high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia

CP : chronic pancreatitis

した。

## II. 対象および方法

2014年から2019年の6年間に当院内視鏡センターで膵癌の精査目的に行われたSPACE症例は113例で、そのうち36例に対して膵切除術が行われた。膵切除36例のうち、最終病理診断が浸潤性膵管癌であったものは13例、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary-mucinous neoplasm : IPMN) は11例であったが、12例は高異型度PanINのみであった。本研究では、高異型度PanIN12例 (男性3例、女性9例、52~84歳、平均68.6歳) を検討対象とした。対象症例は複数の病理医によりすべて上皮内癌と診断されており、細胞診は全例陽性 (悪性) と判定していた。対照は同時期に行われた慢性膵炎13例のSPACE標本を用いた。対照症例の細胞診判定の内訳は陰性 (良性) 11例、疑陽性 (異型/鑑別困難、良性疑い) 2例であった。細胞診陰性であった11例のうち、1例は膵石があり、化膿性膵管炎を繰り返すことから、膵全摘出術が行われた。細胞診疑陽性の2例は経過観察中に主膵管の狭窄や尾側拡張が増強し、狭窄周囲に低エコー域が出現したことから、腫瘍性病変を否定できず、手術摘出標本にて慢性膵炎と確定された。膵切除術を受けた3例以外の10例は、慢性膵炎として2年以上経過観察されている症例である。

検体採取法としては、ERCP後に0.025インチのガイドワイヤーを主膵管の狭窄部の尾側まで挿入し、5Fr. ENPDカテーテルの先端が狭窄部を越える位置に留置した。留置した当日から1~3時間おきに3回、翌日さらに1~3時間おきに3回、複数の側孔のついたENPDチューブにて原則最大6回膵液を採取した。ENPDチューブには鼻側寄りおよび廃液バッグ寄りにそれぞれ三方活栓を挿着し、その間の新鮮膵液を約2ml採取し、廃液バッグ内の膵液は用いなかった。膵液は水冷した容器に入れてただちに病理検査室に提出した。標本作製法は膵液に3から5倍量の最少必須

**Table 2** Cell arrangement of the round cells

	HGPanIN (n = 10) % (number)	CP (n = 4) % (number)
Clusters	0 (0)	0 (0)
Clusters and isolated cells	60 (6)	0 (0)
Isolated cells	40 (4)	100 (4)

HGPanIN : high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia

CP : chronic pancreatitis

培地 (minimum essential medium : MEM) と22%ウシアルブミン液1滴を加えて混和し、37°Cで2時間インキュベートした後、1000 G、3分間遠心した。沈渣を剥離防止コートスライドにすり合わせ法で塗抹して湿固定の後、パニコロウ染色を行った。

方法は核の偏在傾向を示す類円形細胞の出現率、出現細胞数、出現様式を検討し、これら類円形細胞の核所見 (核形不整、クロマチンの増量や不均等分布、クロマチンの多彩性、核小体) について観察した。出現率における有意差検定にはFisherの正確検定を用いて危険率 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。核の偏在傾向とは核中心性ではない細胞とし、多少とも核が細胞辺縁に偏って位置するものと定義した。類円形細胞とは細胞形が円形に近い細胞で、円柱状や立方状を呈する細胞は除外した。また、細胞の大きさは問わなかった。核形不整とは核の形が不整で類円形でないものとした。クロマチンの多彩性とは細胞相互のクロマチンパターンに差が認められるものと定義した。検討は細胞量が一番多い標本で行った。

## III. 結果

### 1. 核の偏在傾向を示す類円形細胞の出現率、出現細胞数、出現様式

核の偏在傾向を示す類円形細胞は高異型度PanINでは12例中10例 (83%)、慢性膵炎は13例中4例 (31%) に出現していた (Table 1)。p値は0.015で両者に有意差を認めた。

高異型度PanINでは核の偏在傾向を示す類円形細胞は中程度数から多数認められ、10例のうち、6例は集塊状から孤立散在性、4例はほとんどが孤立散在性に出現していた。出現していなかった2例はシート状ないし不規則重積配列を示す細胞集塊のみであった。対照症例では核の偏在傾向を示す類円形細胞は孤立散在性に少数 (対物10倍、10視野あたり平均8個) 認められた (Table 2)。

### 2. 核所見 (Table 3)

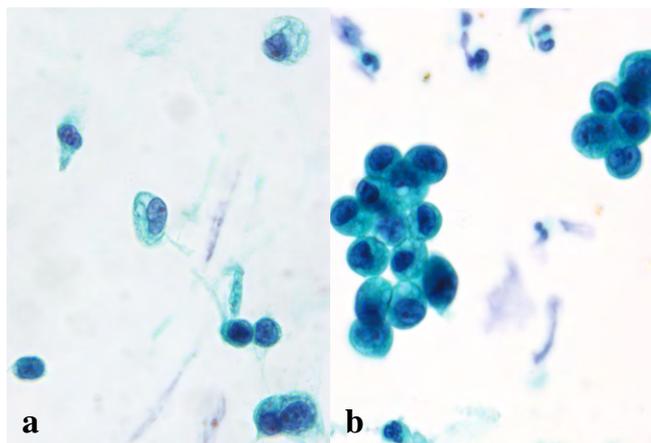
高異型度PanINでは全症例で核形不整、クロマチンの増

Table 3 Nuclear findings of the round cells

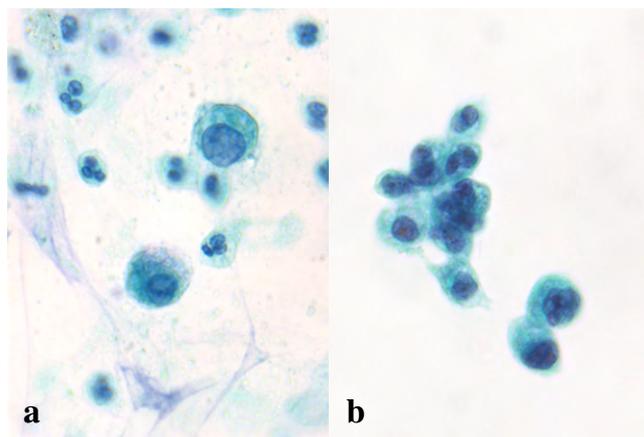
	HGPanIN		CP	
	(n = 10)	% (number)	(n = 4)	% (number)
Irregularly shaped nuclei	100	(10)	50	(2)
Hyperchromasia	100	(10)	50	(2)
Uneven chromatin distribution	100	(10)	0	(0)
Variety of chromatin distribution patterns	100	(10)	0	(0)
Prominent nucleoli	20	(2)	25	(1)

HGPanIN : high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia

CP : chronic pancreatitis



**Fig. 1** Microscopic findings of high-grade PanIN. a : Round cells showing a tendency toward nuclear eccentricity. The chromatin distribution is uneven, and there are differences in the chromatin findings among the cells (Pap. staining,  $\times 63$ ). b : Cell clusters are seen. Chromatin abnormalities and prominent nucleoli are observed (Pap. staining,  $\times 63$ ).



**Fig. 2** Microscopic findings of chronic pancreatitis. a : Round cells showing a tendency toward nuclear eccentricity. Cells with a nuclear membrane are uniform in appearance, and show no increase in chromatin (Pap. staining,  $\times 63$ ). b : No difference was observed in the chromatin distribution patterns among the cells, although they showed nuclear irregularities and increased chromatin (Pap. staining,  $\times 63$ ).

量, クロマチンの不均等分布やクロマチンの多彩性が認められた (Fig. 1a). 核小体は 10 例のうち, 2 例で明瞭であった (Fig. 1b). 慢性膵炎では 4 例中 2 例に核形不整やクロマチンの増量を認めたものの, クロマチンの不均等分布や多彩性はみられなかった (Fig. 2). 明瞭な核小体は 1 例で観察された.

#### IV. 考 察

PanIN とは膵管内に局限する上皮内増殖性病変であり, 通常, 径 5 mm までの顕微鏡的な病変である. 形態学的変化 (構造ないし細胞異型) により, 低異型度 (low-grade) と高異型度 (high-grade) の 2 段階に分類されるが, 高異型度 PanIN は上皮内癌と同義として取り扱われている<sup>10,11)</sup>.

従来, 膵液はセクレチン投与後に採取する方法が一般的であったが, 2004 年に国内製造が中止されたことから, 現

在では膵管擦過, 洗浄液細胞診, リコンビナントセクレチン負荷下細胞診, SPACE など, さまざまな検体採取法が行われている. 近年, 上皮内癌診断における SPACE の有用性についての報告が複数認められる. しかし, それらの報告は細胞所見の記載に乏しく, SPACE における PanIN の細胞学的判定基準は確立されているとはいいがたいと考える<sup>2-4)</sup>. 一方, ERCP 時に採取された膵液細胞診では, Nakaizumi らの複数の報告があり, 正常から浸潤癌までの各病変の細胞所見と鑑別点を詳細に検討し, IPMN 例を中心とした膵液 (pancreatic juice : PJ) 細胞診の判定基準 (PJ 分類) を提唱している<sup>1,7-9)</sup>. PJ 分類は PanIN とも関連するが, 上皮内癌の細胞所見として核の極性の乱れを挙げており, 核の偏在傾向を示す類円形細胞の細胞像を呈示している. 核の偏在傾向を示す類円形細胞の出現率については高異型度 PanIN と慢性膵炎に統計学的な有意差を認めたも

の、慢性膵炎も約 30%の症例に出現していた。したがって、これらの類円形細胞は高異型度 PanIN に必ずしも特異的に出現する細胞ではないといえる。しかし、出現細胞数は両者で大きく異なっていた。出現細胞数の違いは細胞の結合性の強さに原因があると思われるが、弱拡大で容易に認識可能な多くの類円形細胞を認めた場合には悪性判定の手助けとなると考える。細胞の出現様式について PJ 分類<sup>7-9)</sup>では、上皮内癌の細胞は小集団で出現し、むしろ浸潤癌で単個の異型細胞を認めると記載されているが、対象症例のうち、4例は核の偏在傾向を示す類円形細胞がほとんど孤立散在性に出現していた。孤立散在所見のみでただちに浸潤癌を疑うことなく、画像所見も考慮して慎重に取り扱う必要がある。手術摘出標本を観察すると変性を伴う膵管上皮細胞が膵管内に浮遊する像をしばしば認める。浮遊細胞は主に孤立散在性を示し、われわれの検討対象とした核の偏在傾向を示す類円形細胞に形態学的に類似していた (Fig. 3)。検討対象とした細胞は膵管壁を裏打ちして乳頭状に増殖する腫瘍組織からほつれた細胞である可能性を否定できないが、膵管内で浮遊する変性細胞の可能性が高いものと思われる。また、PJ 分類は主にセクレチン負荷下の膵液細胞診であるのに対し、われわれの採取法は ENPD チューブを膵管内に留置して得られた膵液である。PJ 分類との細胞出現様式の不一致の原因は検体採取法や対象症例の違いにあるのかもしれない。標本観察時には細胞集塊に着目しがちであるが、孤立散在性の核の偏在傾向を示す類円形細胞は SPACE における細胞出現様式の特徴の一つと考えられ、これらの類円形細胞の丹念な核観察が必要である。

PJ 分類では、従来の境界病変 (IPMN の高度異型腺腫や PanIN-3 の高度異形成) に相当する高度異型細胞と悪性細胞との鑑別のポイントについて、細胞配列のほかにクロマチンの分布を挙げている<sup>7-9)</sup>。われわれも以前に低異型度と高異型度 PanIN の鑑別におけるクロマチン所見の有用性についての報告をしている<sup>12)</sup>。核の偏在傾向を示す類円形細胞が出現していた慢性膵炎症例では核形不整やクロマチンの増量、明瞭な核小体をもつ症例を認めたものの、クロマチンの不均等分布と多彩性はみられなかった。一つの所見のみにとらわれることなく、クロマチン分布や細胞相互のクロマチン所見の差に着目する必要がある。また、PJ 分類では低異型度 PanIN も核の偏在傾向を示すと記載されているが、低異型度 PanIN の細胞は基本的に円柱状を示し、核の位置も比較的揃っている<sup>7-9)</sup>。それに対し、われわれの検討対象とした細胞は類円形で核偏在の程度はさまざまであった。核の偏在性は悪性判定基準の一つになりうるものであり、核の位置の不規則性にも着目すべきであろう。

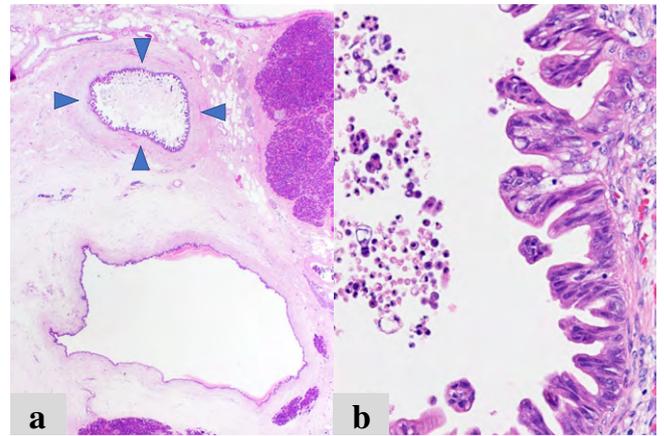


Fig. 3 Histological findings of high-grade PanIN. a, b : Papillary proliferation of tumor cells and numerous isolated scattered cells are seen in a branch of the pancreatic duct (arrowheads) (HE staining, a,  $\times 1.25$ , b,  $\times 20$ ).

明瞭な核小体も悪性の判定に有用であるが、核小体所見のみで良悪を鑑別するのは実際容易ではなく、核小体周囲の明庭所見などクロマチンの所見と併せて観察すべきである。

膵液中の細胞は変性しやすいため、検体採取法や処理法がクロマチン所見に影響を与えている可能性がある。複数の方法で採取された膵癌細胞のクロマチンの染色性について内藤ら<sup>13)</sup>はクロマチンの不鮮明化や濃縮化率は膵管擦過、ブラシ洗浄、膵管内洗浄細胞診に比べて純粹膵液細胞診が最も高かったとし、その原因は消化酵素によるクロマチンの濃縮化にあると述べている。また、ERCP 時の造影剤の混入も固定不良の原因になりうる<sup>14)</sup>。当院では従来、アルブミン液を添加してただちに遠沈法により処理を行っていたが、SPACE は造影剤の影響を受けない検体であり、廃液バッグ内の膵液を用いないことや冷却遠心分離機の使用などの工夫により、細胞変性は少なく、クロマチンの観察は容易であった<sup>12)</sup>。しかし、従来法は検体到着後ただちに固定までの操作を行う必要があり、検体数の増加に迅速な対応が難しくなったことから、細胞変性防止も考慮して組織培養液を添加する方法に変更した。膵液の検体処理法は無添加処理法とゼラチン液や組織培養液などの添加剤を加える方法に分けられる。添加剤を加える方法は細胞の回収率の向上にも役立つが、われわれもアルブミン液や組織培養液、剥離防止コートスライドガラスを用いることで細胞回収率の向上に努めている<sup>8,9,15)</sup>。一方、液状化細胞診 (liquid-based cytology : LBC) は ERCP 下ブラシ細胞診において約 20 年前より試みられているが、採取細胞の乾燥や剥離を防止するとともに、LBC の併用により正診率が向上したと報告されている<sup>16-18)</sup>。今後、膵液における LBC の応用も検討する必要がある。

以上, SPACE における核の偏在傾向を示す類円形細胞の診断的意義について述べた。本検討は症例数が少なく, さらなる症例の蓄積とより客観的な所見の検討が必要である。標本中にはさまざまな形の細胞が認められるが, 核の偏在傾向を示す類円形細胞は悪性判定の手助けとなりうる可能性があり, これらの類円形細胞に着目するとともにクロマチンの不均等分布や多彩性の観察が重要であると考えられる。

著者らは, 開示すべき利益相反状態はありません。

## Abstract

**Objective :** To examine the diagnostic significance of round cells with a tendency toward nuclear eccentricity in serial pancreatic juice aspiration cytologic examinations (SPACE).

**Study Design :** A total of 12 cases of high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HGPanIN) were examined. Microscopic examinations of SPACE specimens were performed to examine the incidence, number, and architectural patterns of round cells showing a tendency toward nuclear eccentricity. Then, the nuclear irregularity of the round cells, such as increase in and uneven distribution of chromatin, variety of chromatin patterns, and nucleoli were observed. The same examinations were conducted on SPACE specimens obtained from 13 cases of chronic pancreatitis (CP) as controls.

**Results :** Round cells showing a tendency toward nuclear eccentricity were found in 10 out of 12 cases (83%) of HGPanIN, and 4 out of 13 cases (31%) of CP. In HGPanIN, the round cells appeared in moderate to high numbers, and the cells showed nuclear irregularities and chromatin abnormalities. In CP, on the other hand, fewer round cells were observed, and none of the cases showed uneven chromatin distribution, and a variety of chromatin patterns were observed.

**Conclusion :** The uneven distribution and variety of chromatin distribution patterns in the round cells with a tendency toward nuclear eccentricity may help in diagnosing malignancy.

## 文 献

- 1) Nakaizumi, A., Tatsuta, M., Uehara, H., et al. Effectiveness of the cytologic examination of pure pancreatic juice in the diagnosis of early neoplasia of the pancreas. *Cancer* 1995 ; 76 : 750-757.
- 2) Kato, S., Zakimi, M., Yamada, K., et al. Efficacy of repeated cytology of pancreatic juice obtained by endoscopic nasopancreatic drainage tube for early diagnosis of pancreatic cancer : a case series including a case of carcinoma in situ. *Clin J Gastroenterol* 2015 ; 8 : 240-246.
- 3) 金子淳一, 松下雅広, 田中祐一・ほか. 膵上皮内癌の超音波

内視鏡像の特徴所見と, 連続膵液細胞診 (Serial pancreatic juice aspiration cytological examination ; SPACE) の有用性について検討しえた一例. *膵臓* 2017 ; 32 : 821-828.

- 4) 豊永啓翔, 湯沼朗生, 植木秀太郎・ほか. 10 mm 以下膵癌診断における連続膵液細胞診の役割. *胆と膵* 2020 ; 41 : 363-367.
- 5) Satoh, M., Kikuyama, M., Kawaguchi, S., et al. Acute pancreatitis-onset carcinoma in situ of the pancreas with focal fat replacement diagnosed using serial pancreatic-juice aspiration cytologic examination (SPACE). *Clin J Gastroenterol* 2017 ; 10 : 541-545.
- 6) Hanada, K., Minami, T., Shimizu, A., et al. Roles of ERCP in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Diagnostics (Basel)* 2019 ; 9 : E30.
- 7) Nakaizumi, A., Takenaka, A., Takamura, R., et al. Cytological criteria of pancreatic juice in intraductal papillary mucinous neoplasms. *Digestive Endoscopy* 2006 ; 18 : S78-S81.
- 8) 中泉明彦, 竹中明美. 膵胆道領域の細胞診 —膵液・胆汁細胞診を中心に—. *病理と臨* 2009 ; 27 : 561-568.
- 9) 中泉明彦, 竹中明美. 膵液細胞診・擦過細胞診の判定基準と有用性. *病理と臨* 2009 ; 27 : 1157-1165.
- 10) WHO Classification of Tumours Editorial Board, eds. WHO Classification of Tumours : Digestive System Tumours, 5<sup>th</sup> ed. Lyon, IARC Press, 2019.
- 11) 日本膵臓学会, 編. 膵癌取扱い規約 第 7 版増補版. 東京, 金原出版, 2020.
- 12) 佐々木健司, 杉山佳代, 神田真規・ほか. 内視鏡的経鼻膵管ドレナージ留置下膵液細胞診における膵上皮内腫瘍性病変の鑑別. *日臨細胞会誌* 2017 ; 56 : 1-8.
- 13) 内藤嘉紀, 岡部義信, 河原明彦・ほか. 採取法の違いによる膵管細胞診の検討. *日臨細胞会誌* 2007 ; 46 : 7-11.
- 14) 池澤 剛, 川村智子, 大貫史明・ほか. ERCP (endoscopic retrograde cholangiopancreatography) 施行時に採取される細胞診標本に対する造影剤の影響. *日臨細胞会誌* 2011 ; 50 : 313-319.
- 15) 佐々木政臣. 液状検体塗抹標本作製法—細胞剥離を起こさないための工夫. *Medical Technology* 2009 ; 37 : 519-520.
- 16) Duggan, M. A., Brasher, P., Medicott, S. A. ERCP-directed brush cytology prepared by the Thinprep method : test performance and morphology of 149 cases. *Cytopathology* 2004 ; 15 : 80-86.
- 17) Volmar, K. E., Vollmer, R. T., Roubort, M. J., et al. Pancreatic and bile duct brushing cytology in 1000 cases : review of findings and comparison of preparation methods. *Cancer* 2006 ; 108 : 231-238.
- 18) 堀口侑奈, 梅澤 敬, 梅森宮加・ほか. 内視鏡的逆行性胆管膵管造影下ブラシ細胞診における BD シュアパス™液状化細胞診の診断精度と標本適否の検討. *日臨細胞会誌* 2015 ; 54 : 238-243.

# 子宮頸部細胞診に出現するクラミジア封入体細胞の特異性

## ——クラミジア核酸増幅検査に基づく検証——

山口沙由莉<sup>1)</sup> 細美 京香<sup>2)</sup> 大田 喜孝<sup>2)</sup> 池田 美穂<sup>1)</sup>

西田 陽子<sup>1)</sup> 富安 聡<sup>2)</sup> 佐藤 信也<sup>2)</sup>

医療法人社団高邦会高木病院検査技術部<sup>1)</sup>, 国際医療福祉大学大学院保健医療学専攻臨床検査学分野<sup>2)</sup>

**目的:** クラミジア感染症の子宮頸部細胞診に出現するとされる細胞質内封入体の特異性について, クラミジア核酸増幅検査成績をもとに検証した。

**方法:** 核酸増幅検査は real-time PCR 法 (qPCR) で行い, 陽性 28 例と陰性 30 例をもとに, 子宮頸部細胞診にみられる封入体の形態学的検索とクラミジア抗体を用いた免疫細胞化学染色 (免疫染色) による検討を行った。

**成績:** qPCR 陽性例・陰性例ともに, 顆粒状封入 (ICI) や標的状所見 (CTF) が約 20% に観察され, 両者に統計的有意差はみられなかった。星雲状封入 (NI) は, qPCR 陽性例のみに認められたが, 出現率は 7.1% と低率であった。qPCR 陽性例のうち, 免疫染色で陽性を示した例は 14.3% と低値であった。3 種の封入体細胞のうち, 免疫染色で陽性を示した封入体は NI の一部のみであり, ICI および CTF はすべて陰性であった。また, 明らかな封入体形成のない変化に乏しい細胞質にも, 免疫染色で明瞭な陽性像が観察された。

**結論:** クラミジア感染症の子宮頸部細胞診に出現するとされた ICI および CTF は, 本感染症に特異的ではないことが示唆される。クラミジア感染細胞は実際には細胞形態の変化に乏しく, 細胞診での検出には限界があると考えられる。

**Key words :** *Chlamydia trachomatis* genital infection, Nucleic acid amplification test, Uterine cervical cytology, Immunocytochemical staining, Intracytoplasmic inclusions

### I. はじめに

クラミジア・トラコマチス *Chlamydia trachomatis* (クラミジア) 感染症は国際的に最も頻度の高い性感染症であり, わが国においてもその蔓延が社会問題となっている<sup>1-3)</sup>。特に女性に感染した場合, 子宮頸管炎, 子宮内膜炎, 卵管炎の原因となり, 重症化すると骨盤内炎症性疾患 (pelvic inflammatory disease : PID) や肝周囲炎 (Fitz-Hugh-Curtis 症候群) をきたすことがある。また, 不妊の原因となったり, 経膈分娩された新生児の肺炎や結膜炎の原因にもなりうる<sup>4,5)</sup>。これらの重要性から, 妊婦検診や不妊外来診療のスクリーニング検査として, クラミジア検出を目的とした核酸増幅法が積極的に導入されるに至った<sup>2,6,7)</sup>。

Specificity of intracytoplasmic inclusions appearing in uterine cervical cytology for *chlamydia trachomatis* genital infection—Inspection based on the *chlamydia trachomatis* nucleic acid amplification test—

Sayuri YAMAGUCHI<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Kyoka SAIMI<sup>2)</sup>, C. T., J. S. C., Yoshitaka OTA<sup>2)</sup>, C. T., I. A. C., Miho IKEDA<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Yoko NISHIDA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Satoshi TOMIYASU<sup>2)</sup>, C. T., I. A. C., Shinya SATO<sup>2)</sup>, C. T., I. A. C.

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Takagi Hospital

<sup>2)</sup>Department of Medical Laboratory Science Graduate School, International University of Health and Welfare

論文別刷請求先 〒 831-0016 福岡県大川市酒見 141 の 11 医療法人社団高邦会高木病院検査技術部 山口沙由莉

令和 3 年 4 月 22 日受付

令和 3 年 6 月 26 日受理

**Table 1** Target cases (chlamydia trachomatis qPCR-positive 28 cases)

No.	Age	Gravidity Parity	Dept. of Outpatient	Subjective Symptom	Gonorrhoea qPCR	Findings of Cervical Cytology							Immuno*8
						Ec*1	SqM*2	TRe*3	Neu*4	NI*5	ICI*6	CTF*7	
1	15	G0P0	Gynecology	Lower abdominal pain Vaginal discharge	-	+	+	+	+++	+	++	++	+
2	42	G1P0	Infertility	NC	-	+	+	-	+++	-	-	-	-
3	33	G0P0	Infertility	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	38	G1P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	+	-	-
5	41	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	+++	-	++	-	-
6	21	G1P1	Obstetrics	NC	-	+	+	+	+++	-	-	-	+
7	21	G0P0	Obstetrics	NC	-	-	+	-	+++	-	-	-	-
8	34	G1P0	Obstetrics	Pruritus	-	+	+	+	+++	-	-	-	-
9	19	G0P0	Gynecology	Lower abdominal pain Condyloma acum.	-	-	+	-	+++	-	-	-	-
10	21	G0P0	Gynecology	Vulva pain	-	+	+	++	+++	-	++	+	-
11	30	G0P0	Gynecology	Genital bleeding	-	+	+	+	+++	-	-	-	+
12	23	G1P0	Gynecology	Vaginal discharge	-	+	+	-	+	-	-	-	-
13	20	G0P0	Gynecology	Leucorrhoea	+	+	++	-	+++	-	-	-	-
14	28	G0P0	Gynecology	Yellow vaginal discharge	-	+	+	+	+++	-	-	-	-
15	17	G0P0	Gynecology	Lower abdominal pain Dysmenorrhoea	-	+	+	-	++	-	-	-	-
16	19	G0P0	Gynecology	Lower abdominal pain	-	+	+	+	++	-	-	-	-
17	37	G3P0	Infertility	NC	-	+	+	+	++	-	+	-	-
18	35	G1P0	Infertility	NC	-	-	+	-	+++	-	-	-	-
19	35	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
20	19	G0P0	Gynecology	Vaginal discharge	-	+	-	-	++	-	-	-	-
21	27	G0P0	Infertility	NC	-	-	-	-	++	-	-	-	-
22	24	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	+++	-	-	-	-
23	38	G2P2	Gynecology	Vaginal discharge Dysmenorrhoea	-	+	+	+	++	-	-	-	+
24	19	G1P0	Gynecology	Lower abdominal pain	+	+	+	+	+++	-	-	-	-
25	23	G0P0	Gynecology	Leucorrhoea	-	+	+	-	++	-	-	-	-
26	25	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	++	+	+	-	-
27	28	G1P0	Infertility	NC	-	+	+	+	+++	-	-	-	-
28	18	G1P1	Obstetrics	NC	-	+	+	+	+++	-	-	-	-

\*1 : Endocervical glandular cells (Ec)

\*2 : Squamous metaplastic cells (SqM)

\*3 : Tissue repair cells (TRe)

\*4 : Neutrocytes (Neu)

\*5 : Nebular inclusion (NI)

\*6 : Intracytoplasmic inclusion (ICI)

\*7 : Central target formation (CTF)

\*8 : Immunocytochemical staining using antichlamydial monoclonal antibody (Immuno)

一方, クラミジア感染症の子宮頸部細胞診において, 特徴的な細胞質内封入体が出現することを Naib<sup>8)</sup>が報告して以来注目され, 多くの追試・研究がなされてきた<sup>9~20)</sup>. しかし, その内容はさまざま, 封入体の形状も複数あり, 子宮頸部細胞診標本に封入体細胞を認めることでクラミジア感染症の推定が可能との見解が示される一方で, 本症と封入体細胞出現との関係を疑問視する報告もみられる<sup>17,20)</sup>.

今回われわれは産婦人科外来や不妊外来におけるクラミジア核酸増幅法検査結果をもとに, 子宮頸部擦過細胞診標

本にみられる細胞質内封入体の形態学的ならびに免疫細胞化学的検討を行い, これまで報告されてきた各種クラミジア封入体細胞の特異性について検証した.

## II. 対 象

高邦会高木病院にて, 2015年8月から2018年3月までの2年8ヵ月の間に, 産科・婦人科外来ならびに不妊外来において, クラミジア核酸増幅法検査を実施した1641例を

Table 2 Control cases (chlamydia trachomatis qPCR-negative 30 cases)

No.	Age	Gravidity Parity	Dept. of Outpatient	Subjective Symptom	Gonorrhoea qPCR	Findings of Cervical Cytology							Immuno*8
						Ec*1	SqM*2	TRe*3	Neu*4	NI*5	ICI*6	CTF*7	
1	29	G1P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
2	23	G0P0	Gynecology	Vaginal discharge Genital bleeding	-	+	+	+	++	-	-	-	-
3	42	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
4	39	G2P1	Infertility	NC	-	+	-	-	++	-	-	-	-
5	34	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
6	35	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	+	-	-	-	-
7	43	G5P2	Infertility	NC	-	+	-	-	+	-	-	-	-
8	28	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
9	29	G1P1	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	+	-	-
10	40	G2P0	Infertility	NC	-	+	-	-	+	-	-	-	-
11	33	G2P1	Infertility	NC	-	+	+	-	+	-	-	-	-
12	21	G0P0	Gynecology	Dysmenorrhea	-	-	-	-	++	-	-	-	-
13	26	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
14	31	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	++	-	-	-	-
15	44	G3P3	Gynecology	NC	-	+	+	+	++	-	+	+	-
16	29	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	+++	-	-	-	-
17	44	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
18	33	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	+	-	-
19	42	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
20	32	G0P0	Infertility	NC	-	+	-	-	++	-	-	-	-
21	37	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
22	28	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	++	-	-	-	-
23	34	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	++	-	-	-	-
24	33	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	++	-	-	-	-
25	35	G1P1	Infertility	NC	-	-	+	-	++	-	-	-	-
26	37	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	+	++	-	+	-	-
27	33	G1P1	Infertility	NC	-	+	+	+	+	-	+	-	-
28	35	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	+	-	-	-	-
29	35	G1P0	Infertility	Past chlamydia infection	-	+	+	+	++	-	+	-	-
30	34	G0P0	Infertility	NC	-	+	+	-	+	-	-	-	-

\*1 : Endocervical glandular cells (Ec)

\*2 : Squamous metaplastic cells (SqM)

\*3 : Tissue repair cells (TRe)

\*4 : Neutrocytes (Neu)

\*5 : Nebular inclusion (NI)

\*6 : Intracytoplasmic inclusion (ICI)

\*7 : Central target formation (CTF)

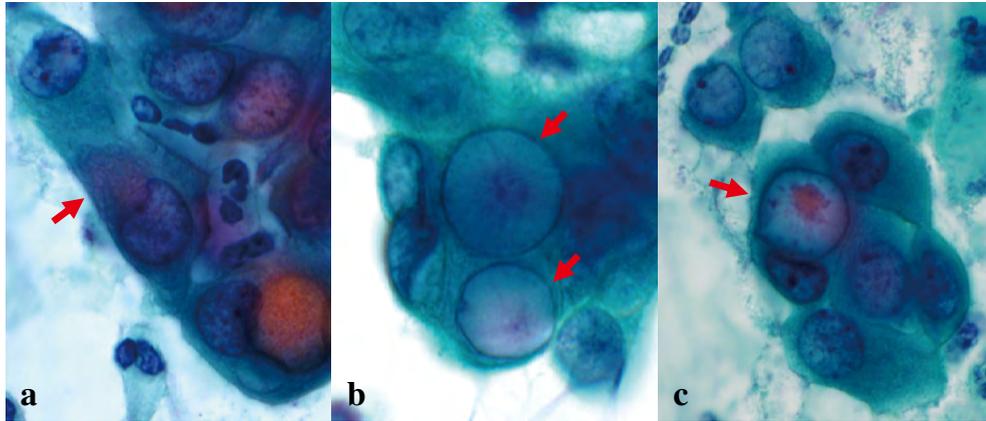
\*8 : Immunocytochemical staining using antichlamydial monoclonal antibody (Immuno)

検討の母集団とした。

このうち、クラミジア核酸増幅法検査陽性であり、同時に子宮頸部細胞診を併施した28例(年齢15~42歳, 平均26.8歳)を対象とした(Table 1)。同じく母集団の中で、クラミジア核酸増幅法検査陰性であり、かつ子宮頸部細胞診が併施された症例より無作為に選択した30例(年齢21~44歳, 平均33.9歳)を陰性対照とした(Table 2)。なお、クラミジア陽性例ならびに陰性対照例のすべてが性交経歴を有し、クラミジア陽性28例中妊娠経験11例(39.3%)、

出産経験3例(10.7%)、クラミジア陰性対照30例中妊娠経験10例(33.3%)、出産経験7例(23.3%)であった。また、クラミジア陽性28例中2例(7.1%)に淋菌の重複感染を認めた。

本研究は医療法人社団高邦会倫理審査委員会(承認番号:315)ならびに国際医療福祉大学倫理委員会(承認番号:19-Ifh-025)の承認を得て実施した。

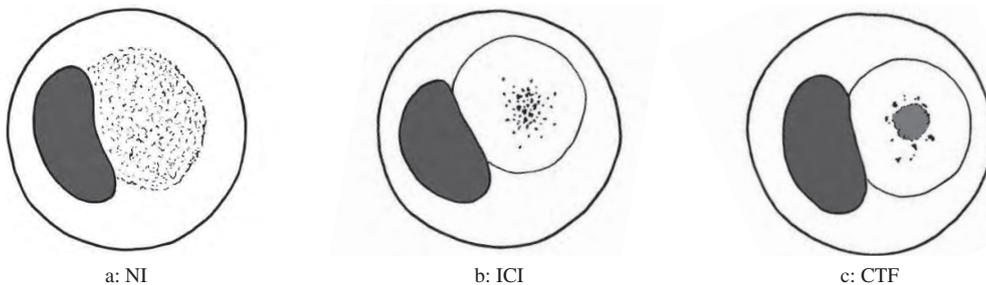


**Fig. 1** Cytologic features of the three types of inclusions, Papanicolaou staining,  $\times 100$ .

a : Nebular inclusion : NI (arrow). The cell shown in this photograph was detected in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 1.

b : Intracytoplasmic inclusion : ICI (arrows). The cell shown in this photograph was detected in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 5.

c : Central target formation : CTF (arrow). The cell shown in this photograph was detected in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 10.



**Fig. 2** Schema of the three types of inclusions of the cytomorphologic observation.

a. Nebular inclusion : NI

b. Intracytoplasmic inclusion : ICI

c. Central target formation : CTF

### III. 方 法

#### 1. クラミジア核酸増幅法検査

クラミジア核酸増幅法検査は multiplex real time PCR 法 (quantitative PCR : qPCR) で行った. 綿棒にて採取した子宮頸部擦過物を材料とし, 検出キットはアキュジーン<sup>®</sup>m-CT/NG (Abbott) を使用. 核酸抽出は Abbott m2000sp<sup>™</sup>自動核酸抽出装置で行い, 解析には Abbott m2000rt<sup>™</sup>アナライザーを用いた.

#### 2. 細胞質内封入体の形態学的観察

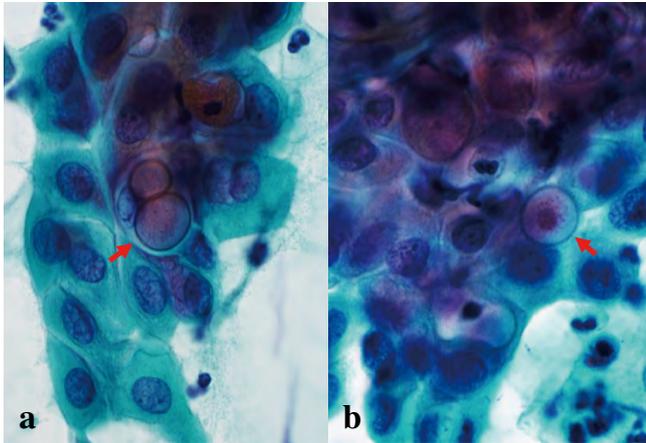
qPCR 陽性 28 例ならびに qPCR 陰性対照 30 例, 計 58 例の子宮頸部細胞診標本 (Papanicolaou 染色) を再鏡検し, クラミジア感染症に出現するとされる細胞質内封入体の出現率を求めた. なお, 子宮頸部からの細胞採取はサーベッ

クスプラシ<sup>™</sup> (Rovers Medical Devices B.V) を用い, 通常塗抹法で細胞診標本を作製した. 細胞質内封入体の形態学的指標は, すでに諸家によって報告されている次の 3 種類の封入体とした.

a. 星雲状封入 nebular inclusion (NI) : Shiina<sup>15)</sup>によって提唱され, ヘマトキシリン好性の雲状の中に  $1\mu\text{m}$  以下の細顆粒を有する封入体. 封入体の境界は不明瞭であるか, あっても薄い境界としてみられる (Fig. 1a, 2a).

b. 顆粒状封入 intracytoplasmic inclusion (ICI) : Naib<sup>8)</sup>, Gupta<sup>10)</sup>らにより報告され, 細胞質空胞内にエオジンあるいはヘマトキシリン好性の顆粒状封入物を認める (Fig. 1b, 2b).

c. 標的状所見 central target formation (CTF) : Gupta<sup>10)</sup>により報告され, 細胞質空胞内にエオジン好性の標的状封入物を認める. クラミジア感染細胞の末期像を示すと



**Fig. 3** Cytologic findings of the inclusions found in *Chlamydia* qPCR-negative cases, Papanicolaou staining,  $\times 100$ .  
 a : Intracytoplasmic inclusion : ICI (arrow). The cell shown in this photograph was detected in *Chlamydia* qPCR-negative case No. 27.  
 b : Central target formation : CTF (arrow). The cell shown in this photograph was detected in *Chlamydia* qPCR-negative case No. 15.

されている (Fig. 1c, 2c).

### 3. 細胞質内封入体の免疫細胞化学的染色および特殊染色による観察

免疫細胞化学的染色(免疫染色)による観察については、封入体細胞の形態学的観察終了後、qPCR陽性標本28例ならびにqPCR陰性標本30例の脱Papanicolaou染色を行い、抗クラミジア・モノクローナル抗体を用いて免疫染色を施した。

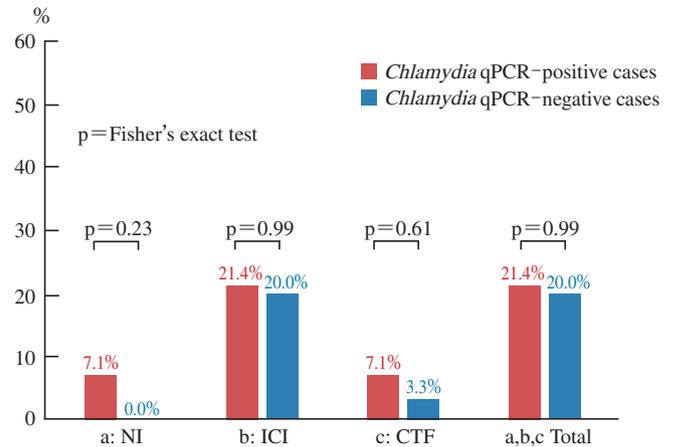
なお、免疫染色は高感度とされる標識酵素ポリマー法で行い、1次抗体は抗クラミジア・モノクローナル抗体MON8004 (MONOSAN) を、2次抗体はREAL™EnVision™/HRP (Dako) を、発色基質にはシンプルステインAEC溶液(ニチレイバイオサイエンス)を用いた。免疫染色標本観察後は、95%エタノールで発色色素の脱色を行ったのち、再度Papanicolaou染色(戻しPapanicolaou染色)を行い、免疫染色所見との詳細な比較を行った。

また、特殊染色として封入体細胞(ICI, CTF)を認めた症例の一部に対し、脱Papanicolaou染色後にperiodic acid-schiff (PAS), alcian blue, mucicarmineの3種の染色を施し、ICI, CTFの質的検索を行った。

## IV. 結 果

### 1. 細胞質内封入体の出現率(細胞形態学的観察)

qPCR陽性例において、28例中6例(21.4%)に細胞質内封入体を認めた。6例の封入体は標本上の合計55カ所に



**Fig. 4** A comparison of the incidences of the three types of inclusions in *Chlamydia* qPCR-positive cases and the *Chlamydia* qPCR-negative cases.

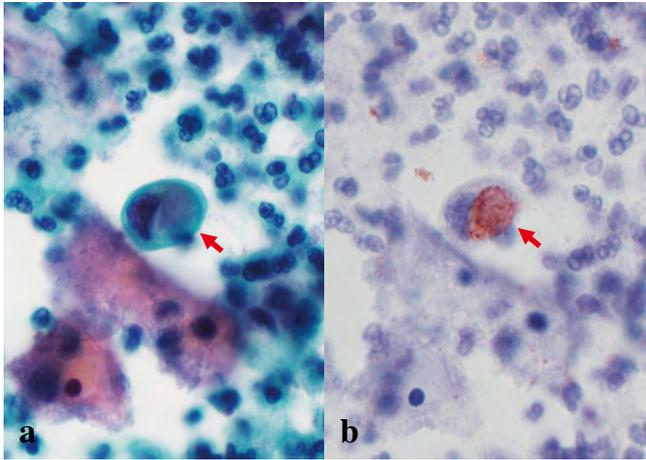
観察され、うち51カ所(92.7%)が扁平上皮化生細胞に、4カ所(7.3%)が頸管腺細胞に認められた。封入体の内訳は、NIが2例、ICIが6例、CTFが2例であった(Table 1)。また、qPCR陰性例においても30例中6例(20.0%)に細胞質内封入体を認めた。6例の封入体は標本上の合計20カ所に観察され、うち18カ所(90.0%)が扁平上皮化生細胞に、2カ所(10.0%)が頸管腺細胞に認められた。封入体の内訳は、ICIが6例、CTFが1例であった(Table 2, Fig. 3)。NIについては、qPCR陽性例のみに認めたが、出現率は28例中2例(7.1%)と低値であった。なお、qPCR陽性例のうち淋菌の重複感染を認めた2例には細胞質内封入体の出現はなかった。

qPCR陽性例およびqPCR陰性例における各種細胞質内封入体の出現率について、両者の有意差検定を行った。検定値は、フィッシャーの正確確率検定より求めた。NIのp値は0.23、ICIでは0.99、CTFでは0.61であり、qPCR陽性例とqPCR陰性例の封入体出現率に統計的有意差は認められなかった(Fig. 4)。

その他の特筆すべき細胞所見として、qPCR陽性例ではICI, CTFが出現した6例中5例(83.3%)に、qPCR陰性例ではICI, CTFが出現した6例中4例(66.7%)に修復上皮細胞を認めた(Table 1, 2)。

### 2. 封入体細胞形態と免疫染色所見および特殊染色所見の比較

qPCR陽性例における免疫染色陽性率は、28例中4例(14.3%)であった(Table 1)。4例のうち1例(qPCR陽性症例No. 1)には初回の細胞診スクリーニングで細胞質内封入体(ICI, CTF)を認めたが、これらの封入体細胞に一致した免疫染色陽性像は認められなかった。なお、qPCR陽性症例No. 1には免疫染色において細胞質内に明らかな陽

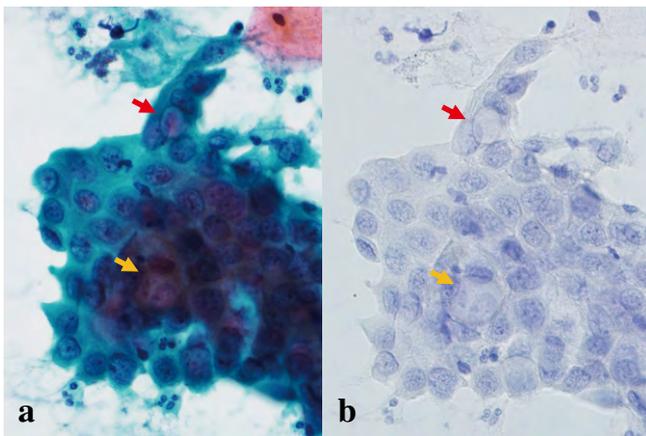


**Fig. 5** An inclusion thought to be a NI (arrow) found in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 1.

a : Papanicolaou staining,  $\times 100$ .

b : Immunocytochemical staining with antichlamydial monoclonal antibody,  $\times 100$ .

We recognized clear positive immunocytochemical staining in the cytoplasm (b), and confirmed the cell as a NI after repeat Papanicolaou staining (a). However, as it was accompanied by a remarkably high number of inflammatory cells, it was not diagnosed as an inclusion in the first cytology screening.



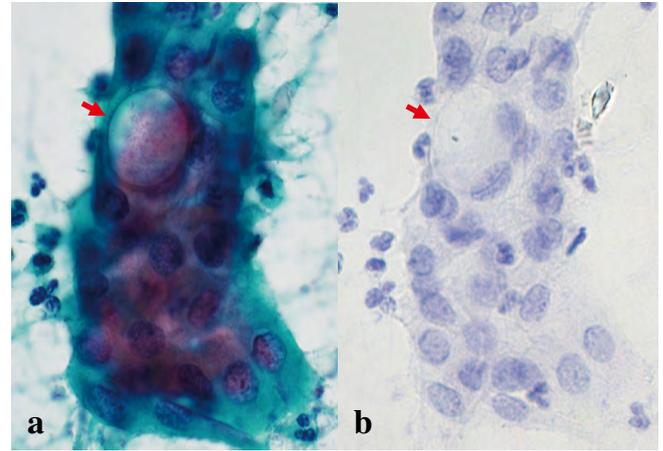
**Fig. 7** CTF and ICI which were detected in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 10.

a : Papanicolaou staining,  $\times 40$ .

b : Immunocytochemical staining with antichlamydial monoclonal antibody,  $\times 40$ .

We detected a CTF (red arrow) and an indistinct ICI (yellow arrow) amidst the cluster of squamous metaplastic cells (a), but both showed negative results of immunocytochemical staining (b).

性像を認め、戻し Papanicolaou 染色で再鏡検の結果、封入体の形態より NI と判断した (Fig. 5)。しかし、著しい炎症細胞の増多を伴っていたこともあり、初回の細胞診スク



**Fig. 6** An ICI (arrow) found in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 17.

a : Papanicolaou staining,  $\times 100$ .

b : Immunocytochemical staining with antichlamydial monoclonal antibody,  $\times 100$ .

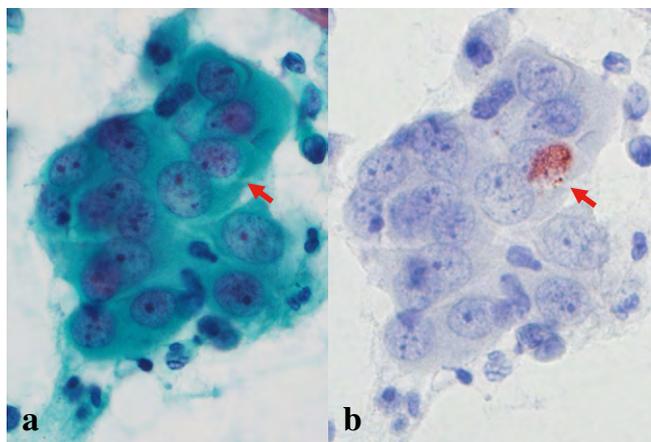
An ICI, shown with an arrow in the endocervical glandular cell cluster, was observed (a), however, the result of CT immunocytochemical staining was negative (b).

リーニングでは封入体細胞として検出することができなかった。

免疫染色で陽性を示した細胞質内封入体は NI の一部のみに (NI は qPCR 陽性症例 No. 1, No. 26 の 2 例に認めたが、免疫染色陽性を示したのは No. 1 のみ) で、ICI や CTF の封入体はすべて免疫染色陰性であった。qPCR 陽性症例 No. 17 では頸管円柱上皮細胞集塊内に介在する ICI を認めたが (Fig. 6a)、同部の免疫染色結果は陰性であった (Fig. 6b)。同じく qPCR 陽性症例 No. 10 で扁平上皮化生細胞集塊内に介在する CTF と、やや不明瞭な ICI を認めたが (Fig. 7a)、免疫染色結果はいずれも陰性を示した (Fig. 7b)。免疫染色陽性を示した 4 例のうち 3 例は、明らかな封入体形成がないにもかかわらず細胞質に明瞭な陽性像を認め、これらの細胞の種類は 3 例ともに扁平上皮化生細胞であった。Fig. 8 は qPCR 陽性症例 No. 6 に認められた所見である。免疫染色にて扁平上皮化生細胞集塊内に明らかな陽性像を認め (Fig. 8b)、戻し Papanicolaou 染色にて同部を詳細に観察したが、明らかな封入体形成や細胞質の目立った変化は認められなかった (Fig. 8a)。

なお、陰性対照とした qPCR 陰性例 30 例における免疫染色結果はすべて陰性であった (Table 2)。

ICI, CTF に 3 種の特殊染色 (PAS, alcian blue, mucicarmine) を施した結果は、PAS 染色で封入体部に細顆粒状の弱陽性像を認めたものの、周囲の細胞質にも同等あるいはより強い細顆粒状の陽性像を認め、封入体部に際立った陽性所見ではなかった。なお、alcian blue 染色, mucicarmine



**Fig. 8** Immunocytochemical staining-positive views (arrow) found in *Chlamydia* qPCR-positive case No. 6.

a : Papanicolaou staining, ×100.

b : Immunocytochemical staining with antichlamydial monoclonal antibody, ×100.

We detected clearly positive immunocytochemical staining in a squamous metaplastic cell cluster (b), but repeat Papanicolaou staining showed no evidence of any inclusions or any changes of the cytoplasm (a).

染色は陰性を示した。

## V. 考 察

クラミジア・トラコマチスはその名のとおり、過去には眼科領域のトラコーマ（感染性顆粒結膜炎）を引き起こす原因として広く知られた病原微生物であるが、現在では再興感染症としての性感染症が国内外で深刻な問題となっている<sup>1,2)</sup>。わが国における性器クラミジア感染患者数は、国立感染症研究所のサーベイランスによれば2002年、定点あたりの月間感染者報告数47.6人をピークに2012年までは徐々に減少傾向にあったが、その後ほぼ横ばい（定点あたりの月間感染者報告数26人前後）で推移し、2016年以降、再び微増傾向にある。男女比は2002年のピーク時では女性が男性の1.4倍高かったが、2013年ごろよりほぼ同数となり、2019年は男性が女性をわずかに上回っている。年齢分布は男性が20代前半～30代前半にかけて、女性は20代前半に多いとされている<sup>3)</sup>。本検討で対象としたqPCR陽性28例の平均年齢は26.8歳であった。

性器クラミジア感染症の臨床症状として、男性では尿道炎、女性では頸管炎を起こすが、特に問題となるのは女性の場合は自覚症状に乏しく、クラミジア頸管炎の約70%が無症状とされていることである<sup>5)</sup>。その結果として感染が重症化し、骨盤腔内や腹腔内の炎症を惹起したり、卵管の癒着や通過障害で異所性妊娠や卵管性不妊の原因になるこ

とがある<sup>1)</sup>。また、出産時に児が産道感染し、新生児肺炎や結膜炎の原因になる可能性もある<sup>1)</sup>。このような背景から産科外来や不妊外来ではクラミジア感染のスクリーニング検査が実施されるようになり、2011年からは妊婦健康診査に公費負担としてクラミジア検査が取り入れられるに至った。なお、本検討の対象としたqPCR陽性28例には14例（50%）に何らかの自覚症状が認められ、その内容は帯下や下腹部痛が多かった（Table 1）。

クラミジア検出法には分離培養法、EIA法、抗原検査法、核酸増幅法などがあり、現在では感度・特異度に優れ、実用性の高い核酸増幅法がスタンダードとなり、日常検査として広く用いられるようになった<sup>2,6,7)</sup>。

クラミジアは細胞内でしか増殖できない偏性細胞内寄生菌であり、クラミジア属特有の増殖環（developmental cycle）を有する。すなわち、まず感染性をもつクラミジアの elementary body（EB）が上皮細胞に侵入し、感染後にEBを包み込むように封入体が細胞質内に形成される。次いで封入体内でEBは活性化され reticulate body（RB）に変化する。RBは再びEBへと変化し、EBとRBの増殖により細胞質内の封入体は拡張し最終的に破裂する。放出されたEBは別の上皮細胞に感染していく。こうしたサイクルを48～72時間かけて繰り返す<sup>5,11)</sup>。

子宮頸部細胞診によるクラミジア封入体検出の試みは1970年代に遡る。特に Naib<sup>8)</sup>と Guptaら<sup>10)</sup>が細胞質内封入体としてICIやCTFの存在を報告して以来注目され、多くの研究者により追試、検討がなされてきた<sup>9-20)</sup>。子宮頸部細胞診におけるICIやCTFの検出の有効性が議論されていく中で、Shiina<sup>15)</sup>は子宮頸部スメアに対して抗クラミジア・モノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学的・細胞形態学的検討を行い、クラミジア感染症を診断する上で最も重要なのはNIであることを報告した。その後、ICIやCTFとクラミジア感染症との関係を疑問視する報告が目立つようになる。Clarkら<sup>17)</sup>は252例の婦人科患者を対象にクラミジア培養で陽性となった12例（4.8%）の子宮頸部スメアを詳細に観察したが、クラミジア封入体を検出することはできなかったとし、クラミジア培養陰性例のうちの5例（2.2%）に封入体を認めたことから、子宮頸部スメアによるクラミジア封入体検出は信頼性に欠け、培養法に取って代わるものではないと報告した。また、Henryら<sup>20)</sup>は婦人科患者を chlamydiazyme test（EIA法）で陽性例と陰性例に分け、子宮頸部スメアでCTFとNIについて検索した結果、封入体はEIA陽性例にも陰性例にも認められたとし、さらに電顕的観察を加えたところ、NIのみにクラミジア菌体を認めたことから、NI以外の封入体はクラミジアの刺激によって誘発された可能性はあるものの、特異性はないと

述べている。

われわれの検討では, 子宮頸部細胞診にてクラミジア感染症に出現するとされる ICI および CTF は, qPCR 陽性例および qPCR 陰性例の双方に出現し, なかでも ICI がそのほとんどを占めた。その出現率は, クラミジア qPCR 陽性例, qPCR 陰性例ともに約 20% 程度であり, 両者に統計的有意差は認められなかった。また, 抗クラミジア・モノクローナル抗体を用いた免疫染色による検討では, qPCR 陽性例における陽性率は 28 例中 4 例 (14.3%), qPCR 陰性例では 30 例中 0 例 (0%) であり, 陽性を示した封入体は NI の一部のみで, ICI および CTF は qPCR 陽性例・陰性例ともにすべて陰性を示した。さらに ICI, CTF に対し PAS, alcian blue, mucicarmine の 3 種の染色を行った結果においても明らかな陽性像は認められなかった。これらの検討結果より, ICI および CTF はクラミジア感染症と直接的関係を示す細胞変化ではなく, 子宮頸部の炎症などに反応した非特異的細胞質変化である可能性が高い。今回の検討例における出現細胞についてみると, qPCR 陽性例では ICI, CTF が出現した 6 例中 5 例 (83.3%) に, qPCR 陰性例では ICI, CTF が出現した 6 例中 4 例 (66.7%) に修復上皮細胞を認めており, いずれも強い炎症を伴っていた可能性が示唆される。

NI について Shiina<sup>15)</sup> は子宮頸部スミアのクラミジア感染細胞について細胞形態学的ならびに抗クラミジア・モノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学的検索を行い, Papanicolaou 標本でクラミジア感染と診断可能な所見として NI が最も重要であるとする一方で, NI 陽性細胞は標本中にきわめて少なく, 見落とされやすいとしている。われわれの検討においても, NI は qPCR 陽性例のみに認められたが, その出現率は 28 例中 2 例 (7.1%) と非常に低値であった。2 例のうち 1 例は免疫染色において NI に一致して明らかな陽性像を示したことから, 細胞診における NI の検出はクラミジア感染症を示唆するうえで有効な所見と考える。しかし, 他の 1 例は免疫染色陰性であり, これは椎名らのいう擬 NI や類似構造物<sup>16)</sup>であった可能性が高い。いずれにせよ, NI の細胞形態はこのほか不明瞭であり, 検出に難渋したのは事実である。

クラミジア感染細胞について計良ら<sup>18)</sup> は, クラミジアを感染させた HeLa 細胞を電子顕微鏡的に観察し, 細胞形態の変化はクラミジア封入体による核圧排を認めたほかは, 非感染細胞に比較して核や細胞質に著しい形態変化は認めなかったと述べている。われわれは抗クラミジア・モノクローナル抗体を用いた免疫染色で 4 例の陽性像を認めたが, 4 例中 3 例は封入体形成を認めず, 明らかな細胞質の変化がないにもかかわらず扁平上皮化生細胞の細胞質内に

明瞭な陽性像を認めた。この所見は計良らのクラミジア感染細胞の電顕的検索結果に通じるものと考えられる。すなわち, クラミジア感染細胞は実際には細胞形態学的変化に乏しく, これを子宮頸部細胞診で捉えることには限界があると言わざるをえない。

本論文に関連し, 開示すべき利益相反はない。

本論文の要旨は第 59 回日本臨床細胞学会秋期大会 (横浜) にて報告した。

## Abstract

**Objective :** This study was aimed at evaluating whether intracytoplasmic inclusions (IIs) that are sometimes observed in uterine cervical cytology specimens obtained from patients with *chlamydia trachomatis* (CT) infection are, in fact, specific for CT infection.

**Study Design :** We enrolled a total of 28 patients with CT infection (CT-infected group) and 30 patients without CT infection (non-CT-infected group) as confirmed by real-time PCR (qPCR). Three types of IIs were detected in the cervical cytology specimens : (1) nebular inclusion (NI), (2) intracytoplasmic inclusion (ICI), and (3) central target formation (CTF). To determine if any of the IIs were specific for genital CT infection, we performed immunocytochemistry with anti-CT antibody and calculated both the rates of detection of the IIs and the rate of immunopositivity (IMP) for CT antigen in the cervical cytology specimens of the study subjects.

**Results :** There were no significant differences in the rates of detection of ICI and CTF between the CT-infected and non-CT-infected groups. NI and CT IMP were detected only in the CT-infected group, at the rates of about 7.1% and 14.3%, respectively. Thus, but none of the ICI and CTF, showed CT IMP. In addition, some non-IIs-bearing cells with normal morphology detected in the CT-infected group also showed CT IMP.

**Conclusion :** The data suggest that while the presence of ICI and CTF in cervical cytology specimens may not be specific for CT, the significance of NI needs to be further investigated. The diagnostic ability of cervical cytology for CT infection may be limited.

## 文 献

- 1) 岩破一博. クラミジア感染症. 産婦人科の進歩 2014 ; 66(3) : 323-334.
- 2) 高橋 聡. Chlamydia trachomatis とその診断法. 日本臨床微生物学会雑誌 2018 ; 28 (2) : 77-82.
- 3) NIID 国立感染症研究所感染症疫学センター・サーベイランス. 性器クラミジア発生動向, 2019. <https://www.niid.go.jp/niid/jp/chlamydia-std-m/chlamydia-std-idwrs/10202-chlamydia-21jam.html> (2021.4.1)
- 4) 野口靖之. 性感染症. 性器クラミジアの基礎と臨床. 臨床産

- 婦人科医会誌 2018 ; 72 (1) : 6-11.
- 5) 高橋 聡. 性感染症としてのクラミジア・トラコマチス感染症 ; 最近の話題. *モダンメディア* 2019 ; 65 (4) : 65-71.
  - 6) 性感染症学会. 性感染症診断・治療ガイドライン 2020. 性器クラミジア感染症. 診断と治療社, 東京, 2020, 60-70.
  - 7) 濱砂良一, 川井修一, 安藤由紀子・ほか. Real time PCR 法を用いた淋菌, クラミジア診断の有用性の検討. *感染症学雑誌* 2011 ; 85 (1) : 1-7.
  - 8) Naib, Z. M. Cytology of TRIC agent infection of the eye of newborn infants and their mothers genital tracts. *Acta Cytol* 1970 ; 14 : 390-395.
  - 9) 関口 勲, 鈴木光明, 赤堀彰夫・ほか. 不妊外来におけるクラミジア感染のスクリーニング成績とその細胞所見について. *日臨細胞会誌* 1991 ; 30 (6) : 1068-1072.
  - 10) Gupta, P. K., Lee E. F., Erozan, Y. S., et al. Cytologic investigations in chlamydia infection. *Acta Cytol* 1979 ; 23 : 315-320.
  - 11) Bibbo, M., Wied, G. L. Microbiology and Inflammation of Female Genital Tract, International Cytology Slide Sets, Vol. 30, Chicago Illinois, 1981.
  - 12) Boon, M. E., Hogewoning, C. J. A., Tjiam, K. H., et al. Cervical cytology and chlamydia trachomatis infection. *Arch Gynecol* 1983 ; 233 : 131-140.
  - 13) 久保田浩一, 山内一弘, 河西十九三・ほか. クラミジア頸管炎の細胞像について. *日臨細胞会誌* 1983 ; 22 (2) : 235-242.
  - 14) Borges, R. J., Carmona, O., Machado, H., et al. Chlamydia infection in Papanicolaou-stained cervical smear. *Acta Cytol* 1984 ; 28 : 471-475.
  - 15) Shiina, Y. Cytomorphologic and immunocytochemical studies of chlamydia infections in cervical smears. *Acta Cytol* 1985 ; 29 : 683-691.
  - 16) 椎名義雄, 飯島淳子, 依田さつき・ほか. 婦人科スミアにおける chlamydia 感染の細胞診, 細胞採取法と星雲状封入体の出現頻度との関係. *日臨細胞会誌* 1985 ; 24 (3) : 487-493.
  - 17) Clark, R. B., Schneider, V., Gentile, F. G., et al. Cervical chlamydial infections : diagnostic accuracy of the Papanicolaou smear. *South Med J* 1985 ; 78 (11) : 1301-1303.
  - 18) 計良恵治, 堀内文男, 武田 敏・ほか. Chlamydia 感染の形態的研究. Chlamydia 感染培養細胞の超微形態. *日臨細胞会誌* 1987 ; 26 (1) : 49-56.
  - 19) Sekhri, A., Le Faou, A. E., Tardieu, J. C., et al. What can be expected from the cytologic examination of cervicovaginal smears for the diagnosis of Chlamydia trachomatis infections? *Acta Cytol* 1988 ; 32 (6) : 805-810.
  - 20) Henry, M. R., de Mesy Jensen, K. L., Skoglund, C. D., et al. Chlamydia trachomatis in routine cervical smears. A microscopic and ultrastructural analysis. *Acta Cytol* 1993 ; 37 (3) : 343-352.

## 原 著

## 体腔液細胞診の膵癌細胞における上皮間葉転換癌細胞の細胞形態

村田 和也<sup>1)</sup> 河原 明彦<sup>1)</sup> 内藤 嘉紀<sup>1)</sup> 貞嶋 栄司<sup>2)</sup>  
 安倍 秀幸<sup>1)</sup> 高瀬頼妃呼<sup>1)</sup> 福満 千容<sup>1)</sup> 篠田由佳子<sup>1)</sup>  
 牧野 諒央<sup>1)</sup> 熊谷 天斗<sup>1)</sup> 秋葉 純<sup>1)</sup>

久留米大学病院病理診断科・病理部<sup>1)</sup>, 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<sup>2)</sup>

**目的:** 本検討の目的は, 体腔液中にみられる上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition : EMT) 細胞の細胞形態について検討することである.

**方法:** われわれは臨床病理学的に膵癌と診断され, 体腔液細胞診陽性であった 33 例を対象に, 体腔液中の癌細胞における EMT 関連マーカーの E-cadherin, vimentin および Zinc-finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) 発現を調査し, vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>を示した EMT 細胞の細胞形態を検討した.

**成績:** 体腔液中の膵癌細胞の出現パターンは, 集塊型 12 例 (36.3%), 孤在性型 5 例 (15.2%) および混在型 16 例 (48.5%) に分類された. E-cadherin 陽性細胞は 30 例 (90.9%), vimentin 陽性細胞は 6 例 (18.2%), ZEB1 陽性細胞は 4 例 (12.1%) にみられた. E-cadherin と vimentin 発現は出現パターンに関連性を認めたが, ZEB1 発現は明らかな関連性を認めなかった. EMT 細胞 (vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>) は 4 例 (12.1%) にみられ, 混在型で 2 例, 孤在性型で 2 例認められた. 体腔液中の EMT 細胞は, 孤在性, 類円形細胞で, 緩やかな集塊形成を呈する EMT 細胞もみられた.

**結論:** 体腔液中の EMT 細胞は, 孤在性細胞や緩やかな集塊形成のような出現形態を示し, 線維芽細胞のような紡錘形の細胞変化を示さなかった. したがって, 体腔液中における EMT 細胞の多様性を理解しておく必要がある.

**Key words :** Epithelial-mesenchymal transition, Zinc-finger E-box binding homeobox 1, Immunocytochemistry, Pancreatic cancer, Effusion cytology

## I. はじめに

上皮細胞と間葉系細胞は, 機能と同様に形態も異なっている. 上皮細胞は, 細胞接着分子によりお互いの細胞が接着し極性を保っているのに対し, 間葉系細胞は, そのような極性はなく, 紡錘状の形態をとり, 細胞同士の接着はきわめて少ない<sup>1)</sup>. 上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition : EMT) は上皮細胞が極性を失い, より運動能の高い間葉系細胞へと形質変化する現象であり, 胎児の発生期や創傷治癒過程および癌細胞の浸潤・転移などでみられる<sup>2)</sup>. EMT の誘導と維持には, サイトカインや増殖因子, 細胞内シグナル伝達経路や EMT 誘導転写因子, 細胞表面に存在する接着分子や細胞外マトリックスを含む細胞外微

Cytological features of epithelial-mesenchymal transition cells in effusion cytology in cases of pancreatic cancer

Kazuya MURATA<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Akihiko KAWAHARA<sup>1)</sup>, C. T., C. F. I. A. C., Yoshiki NAITO<sup>1)</sup>, M. D., Eiji SADASHIMA<sup>2)</sup>, C. T., I. A. C., Hideyuki ABE<sup>1)</sup>, C. T., C. M. I. A. C., Yorihiro TAKASE<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Chihiro FUKUMITSU<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Yukako SHINODA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Ryo MAKINO<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Takato KUMAGAE<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Jun AKIBA<sup>1)</sup>, M. D.

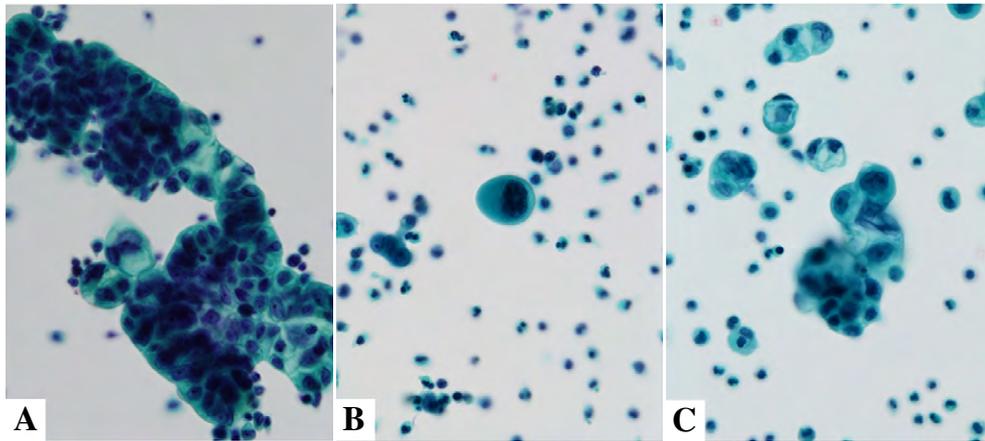
<sup>1)</sup>Department of Diagnostic Pathology, Kurume University Hospital

<sup>2)</sup>Life Science Research Institute, Saga-Ken Medical Center Koseikan

論文別刷請求先 〒 830-0011 福岡県久留米市旭 67 久留米大学病院病理診断科・病理部 村田和也

令和 3 年 5 月 17 日受付

令和 3 年 5 月 24 日受理



**Fig. 1** A : Cytological features of clustered cells in an effusion cytology specimen. The clusters are tight and irregularly shaped. The tumor cell cytoplasm contains mucin.  
 B : Cytological features of isolated cells in an effusion cytology specimen. The isolated tumor cells contain light green cytoplasm without mucin.  
 C : Cytological features of mixed cells in an effusion cytology specimen. The tumor cells are seen as isolated or loosely clustered cells.  
 (Papanicolaou staining,  $\times 40$ )

小環境などが重要な役割を果たしている<sup>3)</sup>。EMT細胞は twist, snail, slug, vimentinあるいは Zinc-finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) などの転写因子や中間径フィラメントの発現上昇を認めるのに対し、E-cadherinなどの細胞間接着因子の発現低下が知られている<sup>4)</sup>。ヒト膵退形成癌や肺多形癌は上皮性成分および肉腫様成分が混在してみられる特殊な癌腫であり、このような肉腫様変化を伴う癌腫では上述するような EMT 関連マーカーの発現亢進が報告されている<sup>5,6)</sup>。

体腔液中に出現する癌細胞は、肺、大腸、胃、膵臓および卵巣に由来する腺癌が大半を占めている。上皮性癌細胞は一般的に集塊形成あるいは孤立散在性の出現パターンを示し、肉腫では孤立散在性に出現する<sup>7)</sup>。これまでわれわれは膵退形成癌の細胞像について報告したが<sup>8,9)</sup>、体腔液細胞診における EMT 細胞に関する報告はほとんどなく、同様に EMT 関連マーカーの発現に関しても不明な点が多い。われわれは体腔液中における膵癌細胞の出現パターンと EMT 関連マーカーとして使用されている E-cadherin, vimentin, ZEB1 発現との関連を調査し、EMT 細胞の細胞形態について検討したので報告する。

## II. 対象および方法

2013 年から 2018 年に臨床病理学的に膵癌患者と診断され、体腔液細胞診で陽性と判定された症例を対象とした。本検討における EMT 細胞は vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>を示した悪

性細胞と定義し、対照に膵退形成癌と診断された 2 例の体腔液細胞診を用いた。なお、膵退形成癌は、vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>の共発現を確認した。

体腔液細胞診検体は、液状化検体細胞診 (liquid-based cytology : LBC) 保存液である BD サイトリッチレッド保存液 (Becton Dickinson, 品番 491336) で細胞の固定を行った。1 晩、BD サイトリッチレッド保存液に保存した後、BD SurePath のプロトコルに従って LBC 標本を作製した。すべての標本はパバニコロウ染色を施行した。

### 1. 体腔液中における膵癌細胞の出現パターン

細胞出現パターンは以下のような基準で 3 つに分類した<sup>10)</sup> (Fig. 1)。なお、分類は 2 名の細胞検査士 (YT・KM) が評価した。

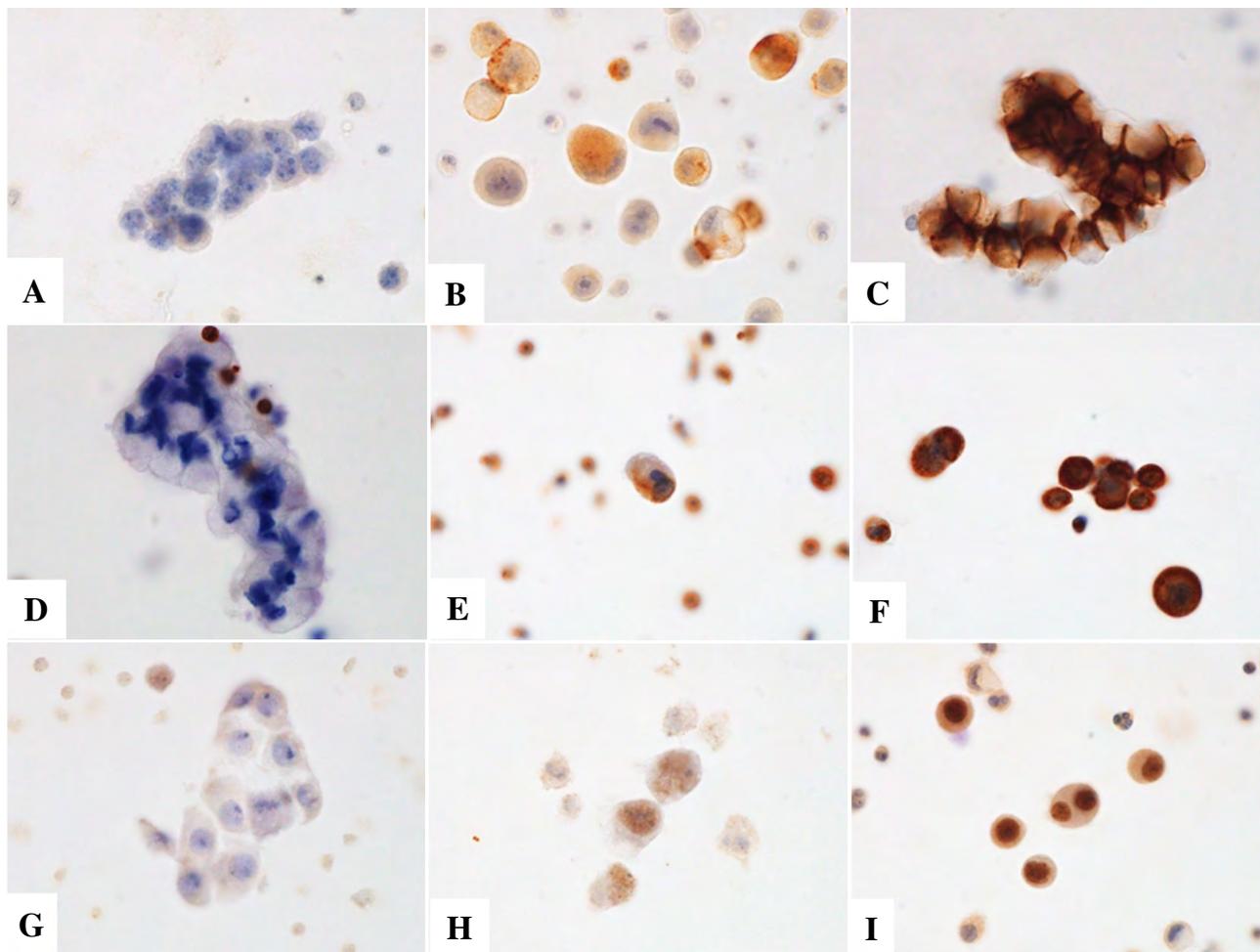
**集塊型**：集塊形成 (10 細胞以上からなる) を呈する癌細胞が全癌細胞の 7 割以上にみられた症例

**孤在性型**：孤立散在性に出現する癌細胞が全癌細胞の 7 割以上にみられた症例

**混在型**：集塊型や孤在性型以外の症例

### 2. 免疫細胞化学および評価方法

免疫細胞化学は細胞転写法を用いて複数枚の標本を作製した<sup>11)</sup>。LBC 標本のカバーガラスを取り外した後、マリノール 550cps (武藤化学, 品番 20401) を塗布し伸展器で 1 晩硬化させた。トリミング用カミソリ (日新 EM, 品番 4291) で切り抜いた後、別のコーティングスライドガラス (松浪硝子工業, 品番 CRE-13) に張り付け伸展器 (約 50°C) で 1 晩乾燥させた。その後、キシレン (武藤化学, 品番 249-



**Fig. 2** Immunocytochemical staining of effusion LBC samples. Tumor cells with absent or weak staining intensity were considered to show negative staining (A, D, G), and tumor cells showing moderate (B, E, H) or strong staining intensity (C, F, I) were considered to show positive staining (A-C : E-cadherin, D-F : vimentin, G-I : ZEB1,  $\times 100$ ).

00097) でマリノールを除去し, 免疫細胞化学を行った。

自動染色装置 Bond III (Leica Microsystems) を用いて施行した。E-cadherin 抗体 (1 : 200, clone NCH-38, Dako cytometry) を用いた免疫細胞化学は, retrieval solution (ER) 2 (pH9.0) で 20 分間賦活化後, 一次抗体を 30 分間反応させた。ZEB1 抗体 (1 : 200, clone CH419 Bethyl Laboratories Montgomery) は, ER2 で 15 分間賦活化後, 一次抗体を 30 分間反応させた。Vimentin 抗体 (ready to use, clone V9, Dako cytometry) は, ER 1 (pH6.0) で 10 分間賦活化後, 一次抗体を 10 分間反応させた。一次抗体反応後の 2 次抗体は, Refine polymer detection system キット (Leica Microsystems) を用いて 30 分間反応させ, 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) で可視化させた。

発現率の解析は, 1 例に対しデジタル画像をランダムに 5 視野撮影し, 陽性細胞数を数えた。E-cadherin は細胞質/膜を, ZEB1 は核を, vimentin は細胞質を発現部位とし,

**Table 1** Patient characteristics, cytological patterns and immunocytochemistry

Clinicopathological variables	n = 33
Age, mean (SD)	64.7 (10.2)
Gender, M/F (%)	20 (60.6)/13 (39.4)
Cytological patterns, clustered type/ isolated type/mixed type (%)	12 (36.3)/5 (15.2)/16 (48.5)
Number of positive cases	
E-cadherin (%)	30 (90.9)
vimentin (%)	6 (18.2)
ZEB1 (%)	4 (12.1)

中等度発現以上を陽性と判定した (Fig. 2)。発現率 (expression rate) は 2 名の細胞検査士 (YT・KM) がおのおの で評価した。評価が不一致であった症例は再度 2 名で検鏡し すり合わせを行った。全腫瘍細胞の 10% 以上に発現がみられた症例を陽性 (positive case) とした。

Patient	Diagnosis	Age	Sex	cell type	E-cadherin	vimentin	ZEB1
1	PIDC	47	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
2	PIDC	48	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
3	PIDC	63	Male	Clustered type	Positive	ND	Negative
4	PIDC	69	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
5	PIDC	75	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
6	cPC	76	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
7	PIDC	78	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
8	PIDC	57	Female	Mixed type	Positive	ND	Negative
9	PIDC	58	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
10	PIDC	65	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
11	PIDC	69	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
12	PIDC	67	Male	Clustered type	Positive	ND	Negative
13	PIDC	63	Female	Isolated type	Positive	Negative	Negative
14	PIDC	83	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
15	PIDC	49	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
16	cPC	76	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
17	PIDC	66	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
18	PIDC	72	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
19	PIDC	54	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
20	cPC	71	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
21	PIDC	74	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
22	PIDC	65	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
23	cPC	60	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
24	PIDC	59	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
25	cPC	64	Female	Mixed type	Positive	Negative	Negative
26	cPC	47	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
27	PIDC	63	Male	Clustered type	Positive	Negative	Negative
28	PIDC	67	Female	Mixed type	Positive	Positive	Negative
29	PIDC	70	Male	Isolated type	Positive	Positive	Negative
30	PIDC	80	Female	Mixed type	Positive	Positive	Negative
31	PIDC	64	Male	Isolated type	Positive	Positive	Negative
32	cPC	73	Female	Mixed type	Positive	Positive	Negative
33	PIDC	44	Male	Isolated type	Positive	Positive	Positive

%	E-cadherin	vimentin	ZEB1
70-100	Positive	Negative	Negative
50-69	Positive	Negative	Negative
30-49	Positive	Negative	Negative
10-29	Positive	Negative	Negative
0-9	Positive	Negative	Negative
Male	Clustered type	Clustered type	Clustered type
Female	Mixed type	Mixed type	Mixed type
		Isolated type	Isolated type

**Fig. 3** Comparison of the expression rates of the EMT markers E-cadherin, vimentin and ZEB1 in clustered, mixed, and isolated types of tumor cells in effusion cytology specimens obtained from pancreas cancer patients. Almost all clustered cells show positive staining for E-cadherin and negative staining for vimentin and ZEB1. Mixed and isolated types of cells show more intense staining for vimentin and/or ZEB1 as compared to the clustered type of cells. (PIDC : pancreatic invasive ductal carcinoma ; cPC : clinical pancreatic cancer ; ND : not done)

**Table 2** Expression rates of epithelial mesenchymal transition-related markers in various cytological types

	Clustered type (n = 12)	Mixed type (n = 16)	Isolated type (n = 5)	p-value	Clustered type vs. Isolated type	Clustered type vs. Mixed	Isolated type vs. Mixed
E-cadherin (median [range])	100.00 [94.00, 100.00]	60.25 [0.00, 87.20]	9.10 [2.00, 26.30]	<0.001	0.001*	<0.001*	0.006*
vimentin (median [range])	0.00 [0.00, 0.50]	0.00 [0.00, 50.00]	49.50 [5.74, 87.50]	0.003	0.004*	1.000*	0.003*
ZEB-1 (median [range])	0.00 [0.00, 0.00]	0.00 [0.00, 40.80]	0.00 [0.00, 50.30]	0.066	0.091*	0.121*	1.000*

\* : Bonferroni-adjusted p-values

Variables indicates the expression rate of each marker

**Table 3** Appearance rate of EMT cells in effusion cytology (n = 30\*)

		vimentin <sup>-</sup> /ZEB1 <sup>-</sup>	vimentin <sup>+</sup> /ZEB1 <sup>+</sup> (EMT cells)	vimentin <sup>+</sup> /ZEB1 <sup>-</sup>	vimentin <sup>-</sup> /ZEB1 <sup>+</sup>
E-cadherin <sup>+</sup> n = 27					
Clustered type	n = 9	9	0	0	0
Mixed type	n = 16	14	2	0	0
Isolated type	n = 2	1	0	1	0
Total (%)		24 (88.9)	2 (7.4)	1 (3.7)	0 (0)
E-cadherin <sup>-</sup> n = 3					
Clustered type	n = 0	0	0	0	0
Mixed type	n = 0	0	0	0	0
Isolated type	n = 3	0	2	1	0
Total (%)		0 (0)	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0)

EMT : epithelial-mesenchymal transition

\*Three cases in which immunostaining for vimentin could not be performed were excluded.

### 3. 統計学的解析

EMT 関連マーカーの陽性率と出現パターンの関連性はクラスカル・ウォリス検定を適用した。また、それぞれの出現パターン別の比較にはウィルコックソンの順位和検定を用い、ボンフェローニ法により多重性を調整した。なお、統計ソフトウェアは R version 4.0.2 を用い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

本研究は久留米大学病院倫理委員会の承認を受けて実施した (研究番号 : 18075)。

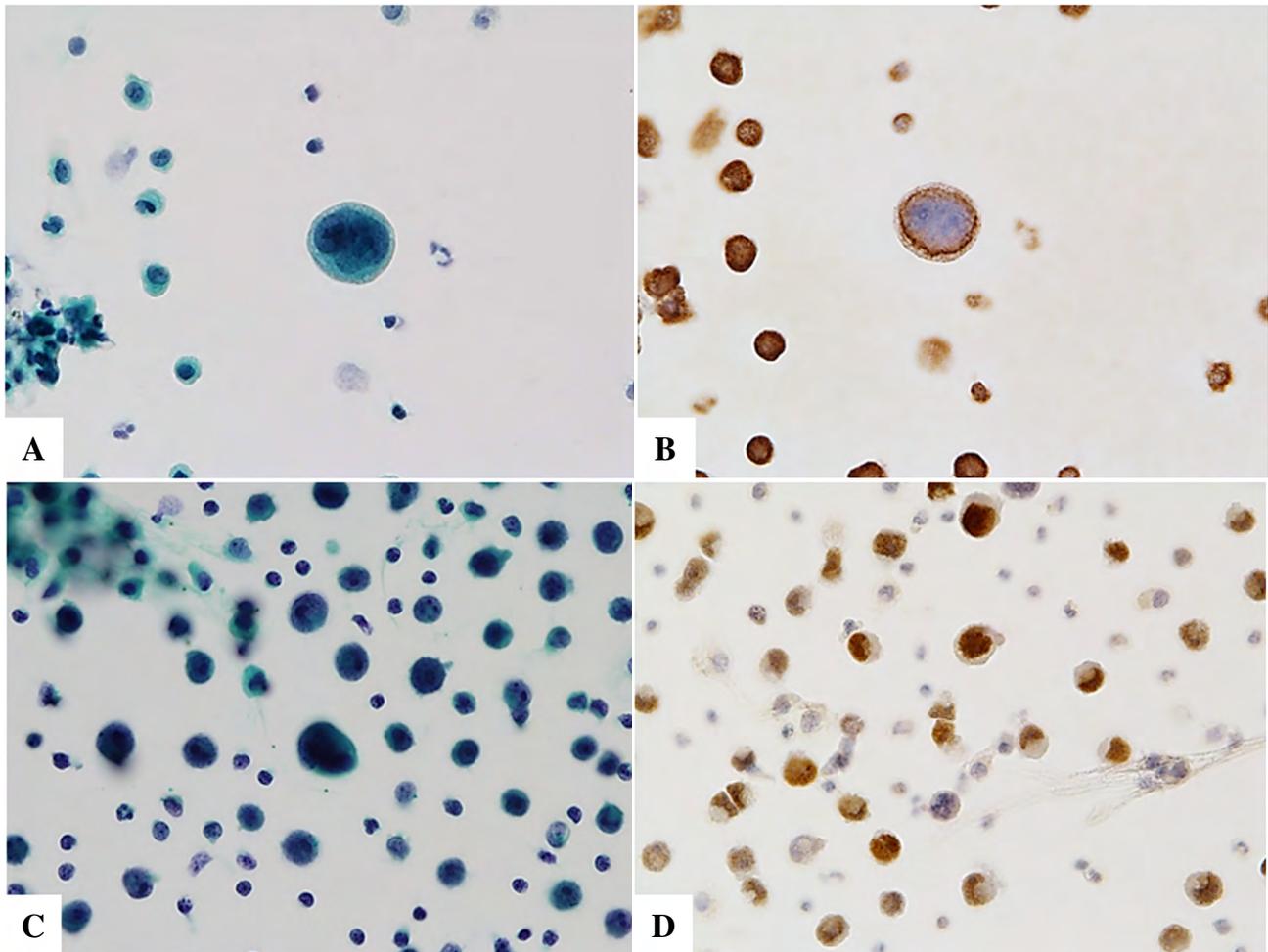
## III. 結 果

臨床病理学的に膀胱癌患者と診断され、体腔液細胞診で陽性と判定された症例は 33 例認められた。内訳は、男性 20 名、女性 13 名で、平均年齢は 64.7 歳であった (Table 1)。組織学的に膀胱癌あるいは膀胱癌疑いと診断された症例が 26

例で、臨床的に膀胱癌と判断された症例は 7 例であった。

### 1. 膀胱癌細胞の出現パターン

体腔液中の膀胱癌細胞の出現パターンは、集塊型 36.3% (12/33 例)、孤在性型 15.2% (5/33 例) および混在型 48.5% (16/33 例) であった。集塊型における膀胱癌細胞は、結合性の強い大型から中型集塊で出現しており、細胞質内の粘液含有所見が多く認められた (Fig. 1A)。孤在性型は、類円形を主体とした膀胱癌細胞を孤立散在性に認め、集塊型の膀胱癌細胞に比べ、粘液産生所見は減少していた (Fig. 1B)。個々の腫瘍細胞の N/C 比は増加し、相互封入像や多核巨細胞を伴う症例もみられた。混在型は集塊形成および孤在性に出現する膀胱癌細胞を認め、症例によって集塊形成の所見が異なっていた。混在型にみられる集塊形成は、集塊型にみられるような大型で結合性の強い集塊から結合性の低下を示すような中型や小型集塊までさまざまであり (Fig. 1C)、対照にした膀胱癌形成癌は混在型の出現パターンであった。



**Fig. 4** Cytological and immunocytochemical features in effusion cytology specimens obtained from pancreatic cancer patients 32 (A and B : E-cadherin<sup>-</sup>/vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>) and 33 (C and D : E-cadherin<sup>-</sup>/vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>). Staining of the cytoplasm for vimentin (B) and of the nuclei for ZEB1 (D) is especially intense in the isolated tumor cells. (Papanicolaou staining (A and C),  $\times 40$ , immunocytochemical staining (B : vimentin, D : ZEB1),  $\times 40$ )

## 2. EMT マーカーの発現

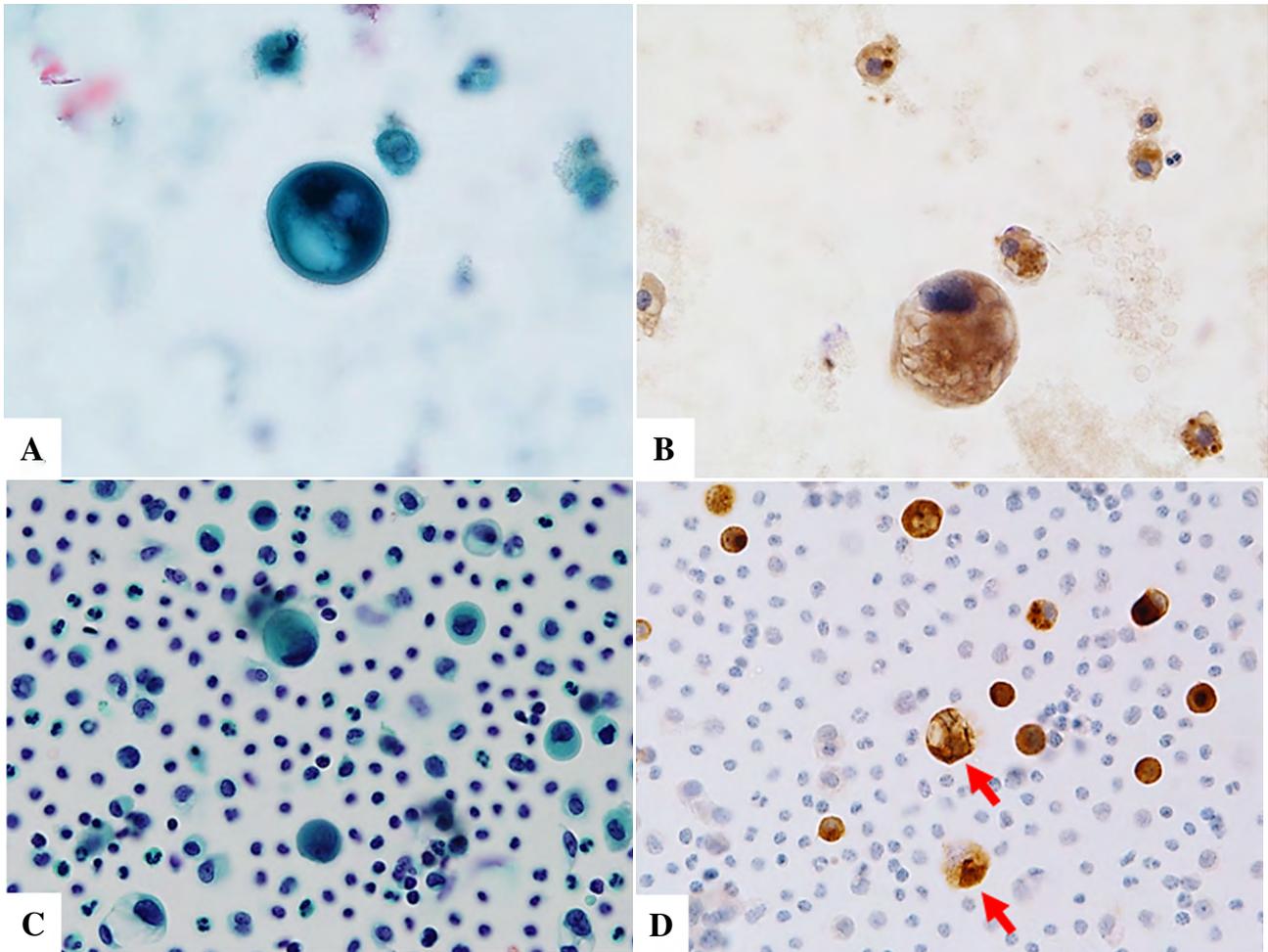
E-cadherin, vimentin および ZEB 1 抗体を用いた免疫細胞化学の、カットオフ値を用いた判定結果を Table 1 に示す。また、各症例における詳細な発現率データを Fig. 3 に示す。集塊型は 12 例のすべてにおいて E-cadherin 陽性 (100%) を示し、vimentin (症例 3, 8, 12 を除く 9 例) と ZEB1 (12 例) の陽性はみられなかった。一方、孤在性型において、E-cadherin 陽性が 2 例 (40.0%) で、vimentin 陽性は 4 例 (80.0%), ZEB1 陽性は 2 例 (40.0%) であった。混在型において、E-cadherin 陽性は 16 例 (100%) にみられ、vimentin と ZEB1 の陽性はそれぞれ 2 例ずつ (12.5%) であった。

## 3. 出現パターンと EMT マーカー発現の関連

Table 2 に出現パターンと EMT 関連マーカーの発現結果を示す。E-cadherin 発現は 3 つの出現パターンに関連性を認め ( $p < 0.001$ ), vimentin は孤在性型で他のタイプに比べ

有意に陽性率が高かった (集塊型 vs. 孤在性型  $p = 0.004$ , 孤在性型 vs. 混在型  $p = 0.003$ : ボンフェローニ法調整済み)。ZEB1 発現と出現パターンは、統計学的に有意な関連性は認めなかった ( $p = 0.066$ )。

EMT 細胞 (vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>) は 4 例 (12.1%, 症例 27, 28, 32, 33) みられ、混在型に 2 例、孤在性型に 2 例認められた (Table 3)。これらの 4 例は、男性 2 名、女性 2 名で、平均年齢は 61.8 歳であった。組織学的に 3 例が浸潤性膵管癌と診断されており、1 例は臨床的に膵癌と判断された症例であった。孤在性型にみられた EMT 細胞は、紡錘形の形態を示さず類円形細胞が孤在性の出現形態を示していた (Fig. 4)。また、孤在性型の中には、vimentin のみ陽性を呈した 2 例 (vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>-</sup>, 症例 30, 31) や、vimentin と ZEB1 の発現がみられない症例 (vimentin<sup>-</sup>/ZEB1<sup>-</sup>, 症例 29) も存在したが、これらの膵癌細胞は、EMT 細胞と類似した細胞形態を呈していた (Fig. 5)。混在



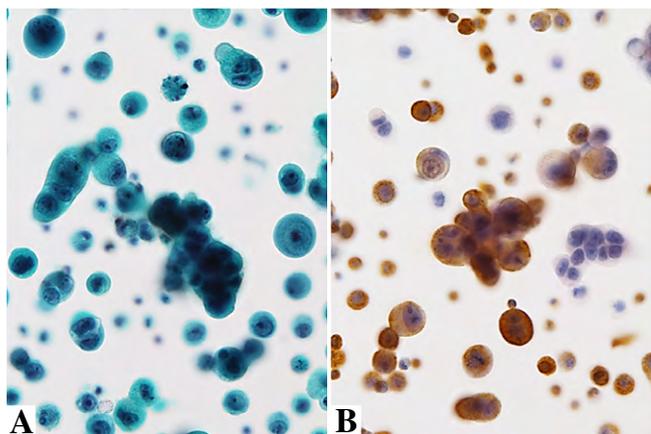
**Fig. 5** Cytological and immunocytochemical features in effusion cytology specimens obtained from pancreatic cancer patients 31 (A and B : E-cadherin<sup>-</sup>/vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>-</sup>) and 29 (C and D : E-cadherin<sup>+</sup>/vimentin<sup>-</sup>/ZEB1<sup>-</sup>). Cytological features of isolated tumor cells in an effusion cytology specimen. The tumor cell nuclei show negative staining for ZEB1 (B). Isolated tumor cells show intensely positive staining of the cytoplasm/cell membrane for E-cadherin (arrows) (D). (Papanicolaou staining (A and C),  $\times 40$ , immunocytochemical staining (B : ZEB1, D : E-cadherin),  $\times 40$ ).

型にみられた EMT 細胞は、中型から小型の集塊形成を示すこともあり、これらの細胞集塊においても EMT 関連マーカーである vimentin や ZEB1 が明瞭に発現していた (Fig. 6).

#### IV. 考 察

EMT は細胞間接着を示す上皮細胞が可動性の高い間葉系細胞へ変化する現象であり、1980 年代はじめに、Hay らによって提唱された<sup>12)</sup>。EMT はトランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor : TGF)- $\beta$  ファミリーに属する各種因子によって誘導されることが知られている<sup>13,14)</sup>。TGF- $\beta$  ホモ二量体は、セリン-スレオニン・キナーゼ型受容体を活性化し、細胞質内のシグナル伝達を経て核内の EMT 関連転写因子ファミリーである snail, slug,

ZEB1 や twist などのさまざまな転写因子を促進していく。その結果、上皮系性質を決定する分子は転写抑制され、間葉系遺伝子群の発現を活性化し EMT が進行する<sup>15)</sup>。このように EMT は、上皮-間葉系にかかわるさまざまな遺伝子群が存在するが、本検討では EMT のもっとも重要な要因の一つとされている E-cadherin とこのプロモーター領域の E-box に結合し、その転写を制御している ZEB1<sup>16)</sup>、および代表的な間葉系マーカーの一つである vimentin に着目して体腔液中の EMT 細胞の形態的特徴を検討した。その結果、E-cadherin と vimentin 発現は出現パターンに関連性を認めたが、vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>を示した EMT 細胞は、孤在性出現のみならず集塊状でも出現し、紡錘形のような細胞形態はみられなかった。したがって、体腔液細胞診の形態観察のみで EMT 細胞の同定は困難であり、EMT 細胞の確認は EMT 関連マーカーが不可欠であった。



**Fig. 6** Cytological and immunocytochemical features in an effusion cytology specimen obtained from pancreatic cancer patient 27 (A and B, E-cadherin<sup>+</sup>/vimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>). The tumor cell cytoplasm shows positive staining for vimentin (B).  
(Papanicolaou staining : (A), ×40, immunocytochemical staining : (B : vimentin), ×40)

体腔液中の腺癌細胞はさまざまな大きさの集塊を形成し、その出現パターンは多彩である<sup>17)</sup>。渡辺らの検討<sup>10)</sup>では乳癌細胞が6割以上にみられた症例を孤立散在性パターンと定義し検討を進めていたが、上述したとおり腺癌体腔液細胞の出現パターンは多彩であるため、本検討では7割以上にみられた症例を集塊型と孤立性型のように定義し、EMT細胞の特徴を評価した。当初EMT細胞は孤立性型の腺癌細胞にのみ観察されると推察していたが、16例の混在型においても2例のEMT細胞を観察した。Abadiら<sup>7)</sup>の報告では、体腔液中の肉腫細胞は、孤立性あるいは緩やかな結合を示す集塊として出現すると記載している。また、個々の細胞は円形から類円形を示し、核不整を有する2核や多核細胞が認められており、われわれが確認できたEMT細胞および対照にした腺癌形成腫と類似する細胞所見であった。興味深いことに、体腔液中のEMT細胞は孤立性出現のみならず、集塊を形成していた。混在型におけるEMT細胞のE-cadherin発現は完全消失ではなく発現減少であったため、弱いながら集塊形成を維持していたと考える。また、Giarnieriら<sup>18)</sup>は、EMT細胞において上皮間の接着結合因子であるE-cadherinの消失と同時に、神経や筋肉の細胞間接着に関与しているN-cadherinの発現増加を確認し、カドヘリンの分子転換が認められたと報告している。肉腫様変化を示すEMT細胞は、体腔液中という特殊な環境下でE-cadherinのような上皮間結合のみならず、密着や接着などのさまざまな細胞結合を誘導しながら浮遊している可能性がある。

ZEB1発現は肉腫様癌の肉腫成分あるいは高悪性度腺癌

で発現を示すことが報告されている<sup>9,19)</sup>。膵管癌において、ZEB1発現は25%、vimentin発現は25.7%の症例にみられると報告されており<sup>16,20)</sup>、本検討における体腔液中のZEB1とvimentinの発現率はやや低値であった。対照とした腺癌形成腫は、組織学的に腺癌形成腫と診断されていたため、原発組織像を反映して多形性に富んだ体腔液細胞像であった。一方、組織生検で浸潤性膵管癌と診断されていた症例28は、原発組織像でvimentin一部弱陽性、ZEB1陰性を示しており、EMT関連マーカーの発現が転移時以降に増加した可能性が推察された。VimentinとZEB1はマーカーの発現時期に違いがあり、vimentinはEMTの比較的早期に発現し、ZEB1はEMT後期に発現することが報告されている<sup>21)</sup>。したがってvimentinは間葉系マーカーとして広いスペクトルをもつタンパクであるため、採取時の腺癌細胞はvimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>-</sup>という発現結果になったかもしれないが、vimentin発現とともにZEB1以外の別のEMTマーカーが関与していた可能性も否定できない。Yangら<sup>3)</sup>の報告において、EMTは癌細胞が数段階のステップを経て上皮系細胞から間葉系細胞へと変化し、おのおのの段階で発現するタンパクや細胞形態も異なると記載している。また、EMTの制御因子は臓器癌で異なっており、Tranらは乳癌モデルマウスではSNAIL1の発現が播種をした癌細胞のみに発現しており、SNAIL1の発現をノックアウトすると癌細胞の転移が抑制されたとしている<sup>22)</sup>。またXuらは同様にモデルマウスでTwistはSNAILやSLUG、ZEB2の発現を亢進させるとともに血管内浸潤や転移を進行させることを明らかにしている<sup>23)</sup>。一方でKrebsらはモデルマウスで腺癌細胞の転移はZEB1の発現が大きく関与しており、SNAILやTwistに依存していないことを報告している<sup>24)</sup>。このように癌種によってEMTマーカーの発現やEMTのメカニズムが異なると考えられる。VimentinやZEB1はEMT細胞の評価として広く使用されていると考えられるが、今後、EMT細胞とEMT関連マーカーの関係については、さらなる検討が必要であると考えられる。

## V. 結 語

われわれは本研究の中で体腔液中のvimentin<sup>+</sup>/ZEB1<sup>+</sup>を示した腺癌細胞をEMT細胞と定義し、細胞学的な評価を行った。このEMT細胞は孤立性出現のみならず、集塊形成などさまざまな出現パターンを示していた。したがって、腺癌体腔液細胞診でEMT細胞の確認には、少なくともZEB1やvimentinのような上皮間葉転換マーカーが不可欠であった。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

## Abstract

**Objectives** : The present study was aimed at clarifying the cytological features of epithelial-mesenchymal transition (EMT) cells in effusion cytology in cases of pancreatic cancer.

**Methods** : We examined the features of EMT cells in the effusion cytology specimens of 33 cases of pancreatic cancer. We analyzed the immunoreactivities of the cells for EMT-related markers, such as E-cadherin, vimentin, and Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), and also the cytological features of the vimentin- and ZEB1-positive EMT cells in the effusion cytology specimens.

**Results** : Pancreatic cancer cells identified in effusion cytology were classified as the clustered type (36.3%), isolated (15.2%) or mixed type (48.5%). The EMT cells showed positive staining for E-cadherin, vimentin, and ZEB1 30 (90.9%), 6 (18.2%), and 4 (12.1%) of the effusion cytology specimens, respectively. Immunoreactivity for the EMT-related markers of E-cadherin and vimentin, but not for that of ZEB1, was closely related to the types of cells. In four of the specimens (12.1%) examined, including 2 with mixed-type cells and 2 with isolated-type cells, the EMT cells showed positive immunoreactivity for both vimentin and ZEB1. The EMT cells in the effusion cytology specimens occurred mainly as isolated, round, and or loosely aggregated clusters of cells.

**Conclusions** : The EMT cells in the effusion cytology specimens appeared as isolated or loosely clustered cells, and did not exhibit fibroblast-like morphological change. Therefore, it is of importance to understand the diversity of EMT cells in effusion cytology specimens.

## 文 献

- Giepmans, B. N., van Ijzendoorn, S. C. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1788 : 820-831.
- Pastushenko, I., Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* 2019 ; 29 : 212-226.
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020 ; 21 : 341-352.
- Zeisberg, M., Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 1429-1437.
- Miura, K., Kimura, K., Amano, R., et al. Analysis of the origin of anaplastic pancreatic cancer and the mechanism of its dedifferentiation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2017 ; 24 : 176-184.
- Matsubara, D., Kishaba, Y., Yoshimoto, T., et al. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Int* 2014 ; 64 : 560-568.
- Abadi, M. A., Zakowski, M. F. Cytologic features of sarcomas in fluids. *Cancer* 1998 ; 84 : 71-76.
- Kubota, N., Naito, Y., Kawahara, A., et al. Granulocyte colony-stimulating factor-producing pancreatic anaplastic carcinoma in ascitic fluid at initial diagnosis : A case report. *Diagn Cytopathol* 2017 ; 45 : 463-467.
- Naito, Y., Kawahara, A., Taira, T., et al. Cytopathological and immunocytochemical findings of pancreatic anaplastic carcinoma with ZEB1 expression by means of touch imprint cytology. *Diagn Cytopathol* 2018 ; 46 : 198-203.
- 渡辺達男, 土屋眞一, 町田智恵・ほか. 少数孤立散在パターンを示す小型乳癌細胞の細胞学的特徴 細胞形態と組織型との関係. *日臨細胞会誌* 1996 ; 35 : 618-625.
- 細胞診標本作製マニュアル「体腔液」. 細胞検査士会, 2008, 19-20.
- Greenburg, G., Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982 ; 95 : 333-339.
- 佐谷秀行. 上皮間葉転換の腫瘍における意義. *家族性腫瘍* 2010 ; 10 : 71-74.
- 齋藤正夫. がん細胞の分化転換と TGF- $\beta$ . *山梨医学雑誌* 2013 ; 26 : 9-14.
- Takahashi, E., Nagano, O., Ishimoto, T., et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 4060-4073.
- Zhang, P., Sun, Y., Ma, L. ZEB1 : at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 2015 ; 14 : 481-487.
- Di Bonito, L., Dudine, S., Falconieri, G. Cytopathology of exocrine pancreatic carcinoma in effusions. *Acta Cytol* 1991 ; 35 : 311-314.
- Giarnieri, E., De Vitis, C., Noto, A., et al. EMT markers in lung adenocarcinoma pleural effusion spheroid cells. *J Cell Physiol* 2013 ; 228 : 1720-1726.
- Ishida, K., Yamashita, R., Osakabe, M., et al. Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Proteins in Pancreatic Anaplastic (Undifferentiated) Carcinoma. *Pancreas* 2019 ; 48 : 36-42.
- Handra-Luca, A., Hong, S. M., Walter, K., et al. Tumour epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2011 ; 104 : 1296-1302.
- Liao, T. T., Yang, M. H. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis : Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. *Cells* 2020 ; 9 : 623-635.
- Tran, H. D., Luitel, K., Kim, M., et al. Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Res* 2014 ; 7 : 6330-6340.
- Xu, Y., Lee, D. K., Feng, Z., et al. Breast tumor cell-specific knockout of Twist1 inhibits cancer cell plasticity, dissemination, and lung metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 : 11494-11499.
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Lasierra Losada, M., et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol* 2017 ; 19 : 518-529.

## 症 例

## 多核巨細胞を多数認めたびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の1例

吉田 美帆<sup>1)</sup> 塚本 龍子<sup>1)</sup> 今川奈央子<sup>1)</sup> 京竹 愛子<sup>1)</sup>  
 二反田隆夫<sup>1)</sup> 小松 正人<sup>2)</sup> 神澤 真紀<sup>2)</sup> 伊藤 智雄<sup>2)</sup>

国立大学法人神戸大学医学部附属病院病理部<sup>1)</sup>, 同 病理診断科<sup>2)</sup>

**背景**：多核巨細胞は病的意義や診断的意義を有する場合と非特異的な場合があるが、今回われわれは、術前穿刺吸引細胞診にて多核巨細胞が多数出現する特異な細胞像を示したびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) の1例を経験したので報告する。

**症例**：10歳代、男性。2ヵ月前に左頸部の腫瘤を自覚。エコー検査では、左頸部耳下腺周囲に境界明瞭な分葉状腫瘤を認め、悪性リンパ腫や神経鞘腫などが疑われた。穿刺吸引塗抹標本では、核片貪食組織球や10核以上の多核巨細胞が多数出現しており、一部の細胞質にリンパ球のemperipolesis様所見が認められた。頸部リンパ節部分生検の術中迅速組織診断では、多数の組織球の出現に加え、細胞診同様、リンパ球のemperipolesis様所見を認め、リンパ増殖性疾患と迅速診断された。永久病理診断では、背景に大型で核形不整を呈するCD20陽性異型リンパ球のびまん性増殖を認め、DLBCLと診断された。なお、S-100, CD1aは陰性であった。

**結論**：細胞診断上の多核巨細胞の診断的意義は明確にはできなかった。しかし、DLBCL症例においても多数の多核巨細胞やRosai-Dorfman病に類似したemperipolesis様所見を示す多核巨細胞が出現することが示された。

**Key words** : Diffuse large B-cell lymphoma, Multinucleated giant cells, Rosai-Dorfman disease, Emperipolesis, Case report

## I. はじめに

多核巨細胞は、さまざまな病態で出現し、日常細胞診標本にしばしば出現する<sup>1)</sup>。これらの多核巨細胞が何らかの

診断の手がかりとなることもあるが、一般的には特異的ではない。細胞診標本に出現する多核巨細胞の大部分は非生理的細胞であり、ウイルス感染など感染に伴う炎症性、異物や慢性刺激による非感染性の反応性、代謝性や腫瘍性などがある<sup>2)</sup>。

今回われわれは、術前穿刺吸引細胞診にて多核巨細胞が多数出現する特異な細胞像を示したびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) の1例を経験したので報告する。

## II. 症 例

症例は10歳代、男性。既往歴は、左心低形成症候群に対しFontan手術歴がある。家族歴は特記事項なし。2ヵ月前に左頸部の腫瘤を自覚。腫瘤の緩徐な増大は認められるも疼痛はなく、当院小児科に精査加療目的に紹介受診となっ

A case of diffuse large B-cell lymphoma with a large number of multinucleated giant cells

Miho YOSHIDA-TANAKA<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Ryuko TSUKAMOTO<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Naoko IMAGAWA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Aiko KYOUTAKE<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Takao NITANDA<sup>1)</sup>, C. T., I. A. C., Masato KOMATSU<sup>2)</sup>, M. D., Maki KANZAWA<sup>2)</sup>, M. D., Tomoo Ito<sup>2)</sup>, M. D., M. I. A. C.

<sup>1)</sup>Department of Pathology, <sup>2)</sup>Department of Diagnostic Pathology, Kobe University Hospital

論文別刷請求先 〒650-0017 神戸市中央区楠町7の5の2 国立大学法人神戸大学医学部附属病院病理部 吉田美帆

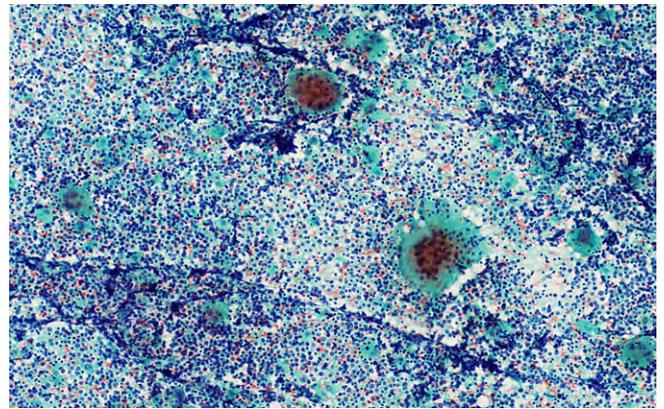
令和2年11月9日受付

令和2年11月9日受理



**Photo. 1** a : Neck ultrasonography of the enlarged cervical lymph node. The mass showed a linear blood flow signal.  
b : T2-weighted MRI : The enlarged cervical lymph node measured 55×42 mm in size.

た。エコー検査では、左頸部耳下腺周囲に 55×42 mm で外頸動脈、内頸動脈、内頸静脈に接する境界明瞭な分葉状腫瘤が認められた。腫瘤内部には線状の血流シグナルを認め、内部エコーは極低～低で周囲への浸潤はみられなかった (Photo. 1a)。MRI の T2 強調画像では、左頸部に等信号を認め、内頸静脈と接していた (Photo. 1b)。画像診断からは、悪性リンパ腫、神経鞘腫が疑われた。血液検査や骨髄検査を施行したが明らかな異常所見は認められず、可溶性インターロイキン 2 レセプター (soluble interleukin-2 receptor : sIL-2R) は 378 U/ml であった。左頸部腫瘤穿刺吸引細胞診が施行され、その後、腫瘤の部分生検術が施行された。



**Photo. 2** Cytological findings of fine-needle aspiration cytology (Papanicolaou staining, objective, ×10). The specimens showed numerous small- to large-sized lymphocytes admixed with a large number of macrophages and multinucleated giant cells.

### III. 細胞学的所見

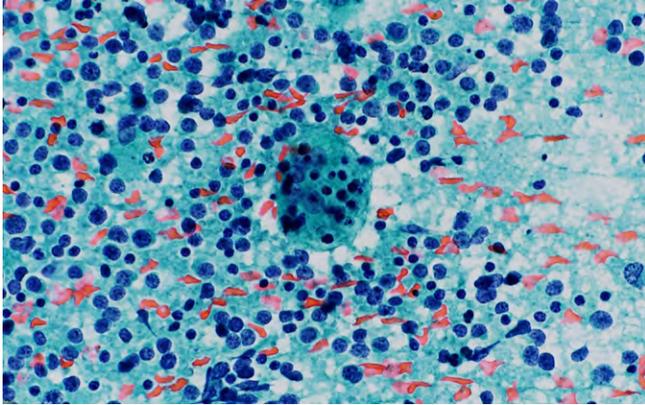
穿刺吸引塗抹標本では、微出血性背景に、小型～大型の各成熟段階のリンパ球が多数出現していた。中～大型リンパ球の一部の核にくびれなどの核形不整を認め、1～2 個の核小体を有する異型リンパ球が出現していた。これらに混在し、組織球や 10 核以上の多核巨細胞が多数みられた (Photo. 2)。10 核以上の多核巨細胞は 1 標本中 122 個出現していた。これらの細胞の一部の細胞質には、リンパ球の emperipolesis 様所見が認められた (Photo. 3, 4)。以上の所見より、鑑別困難、atypical lymphocytes と報告した。追加所見として、肉芽腫性変化の可能性も否定できないが疾患の特定は困難であり、リンパ節の組織生検が望まれると付記した。

### IV. 病理所見

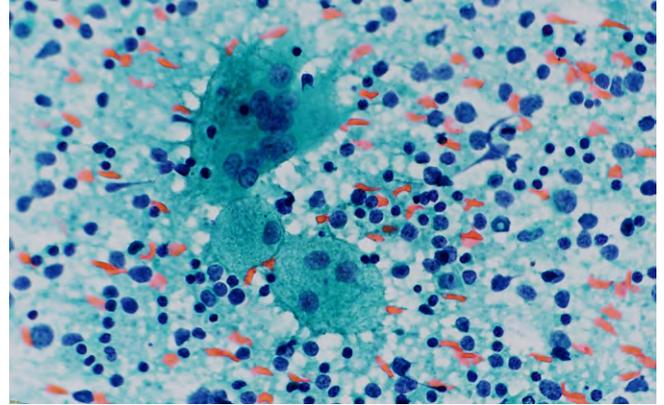
摘出された左頸部リンパ節部分生検検体は、肉眼的に淡いピンク色を呈し表面平滑、弾性軟であった。

#### 1. 迅速病理組織診断

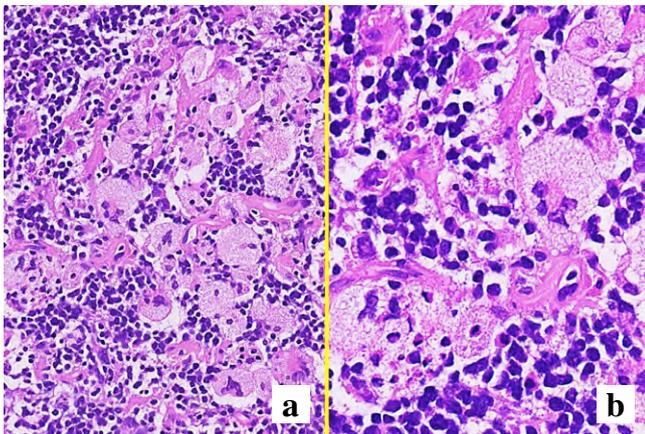
1.0 cm 角の検体が提出された。迅速病理組織標本では、中～大型のリンパ球が均一にびまん性に増生しており、背景には泡沫組織球や多核巨細胞が混在する部分が認められた (Photo. 5a)。また、一部の組織球と多核巨細胞の細胞質には、リンパ球の emperipolesis 様所見が認められた (Photo. 5b)。以上の所見より、リンパ増殖性疾患と迅速診断された。



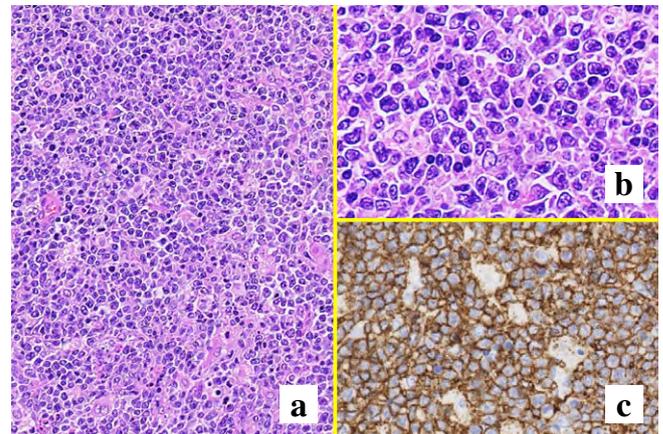
**Photo. 3** Cytological findings of fine-needle aspiration cytology (Papanicolaou staining, objective,  $\times 40$ ). Intermediate- to large-sized lymphocytes showing weak karyotypic irregularity and conspicuous nucleoli.



**Photo. 4** Cytological findings of fine-needle aspiration cytology (Papanicolaou staining, objective,  $\times 40$ ). Multinucleated cells showing viable lymphocytes within the cytoplasm (emperipolesis).



**Photo. 5** Intraoperative rapid histological findings.  
a : Infiltration of middle- to large-sized lymphocytes admixed with macrophages and multinucleated giant cells (HE staining, objective,  $\times 20$ ).  
b : Multinucleated cells showing viable lymphocytes within the cytoplasm (emperipolesis) (HE staining, objective,  $\times 40$ ).

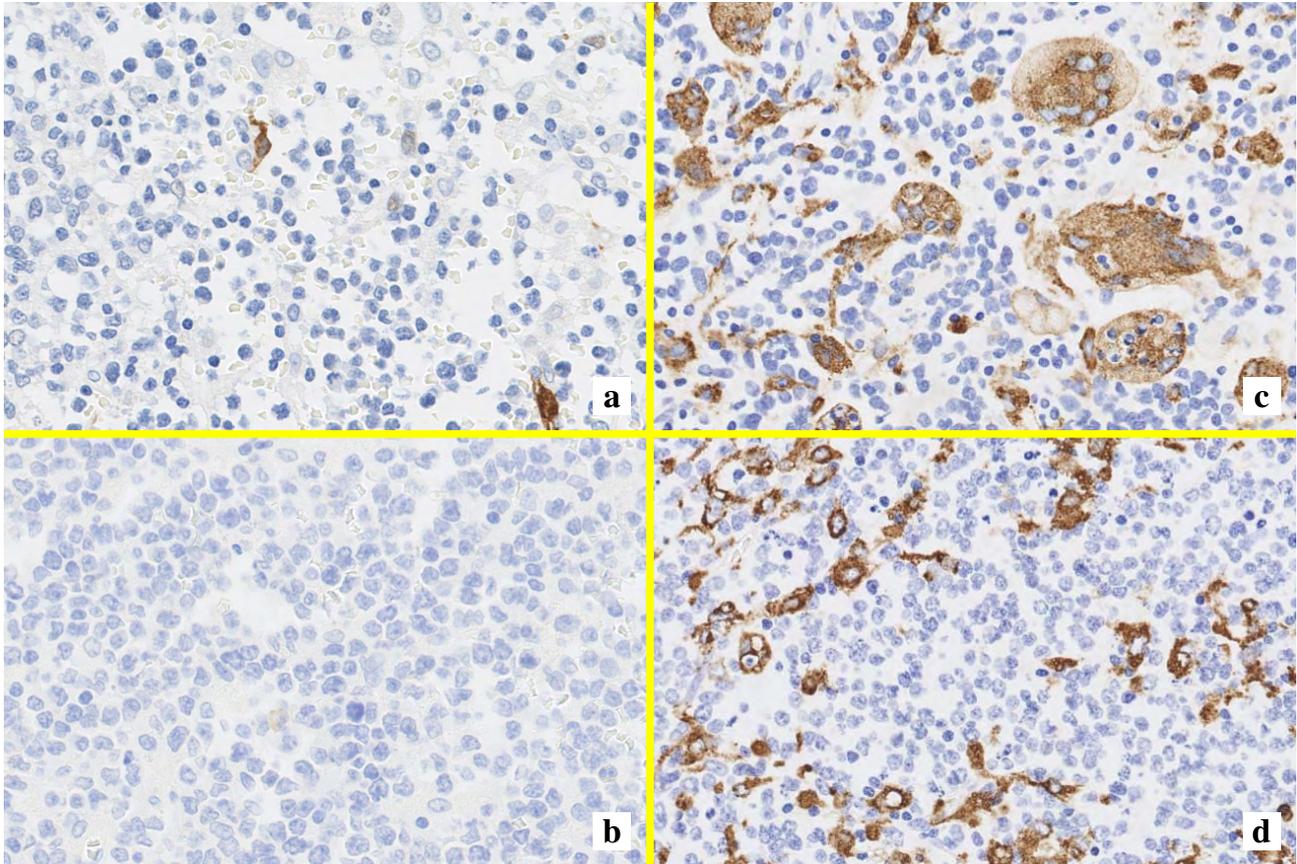


**Photo. 6** Permanent histological findings.  
a : Diffuse infiltration of intermediate- to large-sized atypical lymphocytes with nuclei containing prominent nucleoli, admixed with macrophages (HE staining, objective,  $\times 20$ ).  
b : The intermediate- to large-sized lymphocytes showed strong karyotypic irregularity with nuclear constriction and conspicuous nucleoli (HE staining, objective,  $\times 40$ ).  
c : The tumor cells showed positive staining for CD 20 (Immunohistochemistry, objective,  $\times 40$ ).

## 2. 永久病理組織診断

0.5 cm 角と 1.0 cm 角の検体が提出された。永久病理組織標本では、リンパ節の基本構造は消失しており、中～大型で核形不整を呈する異型細胞がびまん性に増殖していた (Photo. 6a, b)。免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry : IHC) では、これらの異型細胞は CD20, CD79a, CD10, BCL6 陽性で、TdT, BCL2, MYC, MUM1, EBER (*in situ* hybridization : ISH) 陰性、Ki-67 (MIB-1) が約 80% であり、DLBCL, non-double expressor と診断された (Photo. 6c)。鑑別診断としては、バーキットリンパ腫や高悪性度 B 細胞性リンパ腫 (high-grade B-cell lymphoma, NOS) が鑑別となるが、細胞形態はバーキットリンパ腫と

大きく異なり、やや多形性が強い。また、本例では Ki-67 (MIB-1) の陽性率が約 80% とバーキットリンパ腫に比べて低く、DLBCL が最も適切と考えた。また、CD1a, S-100 は陰性であり、ランゲルハンス組織球症や Rosai-Dorfman 病は否定された (Photo. 7a, b)。新鮮材料を用いた FISH (fluorescent *in situ* hybridization) 法により BCL6 遺伝子は分離シグナルの有無を、IGH-MYC 遺伝子は融合シグナルの有無を調べたが、異常シグナルは認められなかった。一方で、PCR (polymerase chain reaction) 法では IGH 遺伝



**Photo. 7** Differential diagnosis (Immunohistochemistry, objective,  $\times 40$ ) (a, b, d : permanent sections, c : intraoperative rapid frozen sections).  
a : S-100 (negative), b : CD1a (negative), c : CD68 (positive), d : CD68 (positive).

子および TRB (T-cell receptor  $\beta$  chain, T細胞受容体  $\beta$  鎖) 遺伝子の monoclonal な再構成が認められた。興味深いことに、永久標本では CD68 (PG-M1) 陽性の組織球を認めるものの、迅速標本に比べて多核巨細胞の出現は少なかった (Photo. 7c, d)。

## V. 考 察

一般に多核巨細胞の多くは組織球由来とされ、組織球同士との融合あるいは反復性核分裂により多核を呈する<sup>3)</sup>。腫瘍細胞が多核巨細胞の形態を示す場合もあるが、本例の多核巨細胞は CD20 (L26) には陰性を示し、CD163, CD68 (PG-M1) が陽性であったため、非腫瘍性、組織球由来と考えられた。成因は不明であるが、腫瘍細胞の壊死などに伴う異物型巨細胞であった可能性がある。

悪性リンパ腫で組織球が豊富に出現する組織型は、T細胞/組織球豊富型大細胞型 B 細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫 (Grade 3) などが挙げられる<sup>4)</sup>。T細胞/組織球豊富

型大細胞型 B 細胞リンパ腫の特徴は、組織球や T 細胞性小型リンパ球が多数出現するなかに大型の B 細胞性異型リンパ球が少数出現する像を呈する<sup>5,6)</sup>。本例の永久組織像や IHC 染色所見には合致しない。その他の型とは、細胞像や IHC 所見が全く異なる。DLBCL は元来多彩な像を呈する型ではあるが、本例のように emperipolesis 様所見を伴う多核巨細胞が多数出現する症例は少数例報告されているのみである。本例のリンパ節穿刺吸引細胞診像から考えられる鑑別疾患では、反応性リンパ節過形成、組織球性壊死性リンパ節炎 (菊池・藤本病)、肉芽腫性リンパ節炎、バーキットリンパ腫、Rosai-Dorfman 病が挙げられる。岸本らの報告では、反応性リンパ節過形成で出現するリンパ球は、小型リンパ球が 80.3%、中型リンパ球が 15.1%、大型リンパ球が 3.7%、その他 0.9% と、小型リンパ球が主体で多彩な像を呈することが特徴とされている<sup>7)</sup>。本例のリンパ球の出現割合は、小型が 50.5%、中型が 41.7%、大型が 6.7%、その他が 1.1% であり、異型中型細胞が多いことから腫瘍性と判断される。組織球性壊死性リンパ節炎で特徴的な三日月状の核片貪食組織球の出現や、肉芽腫性リンパ

Table 1 Immunophenotypic markers

	Our present case	DLBCL	Rosai-Dorfman disease	T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma	Langerhans cell histiocytosis	Burkitt lymphoma
Other	CD20/79a/10+	CD20/79a+	-	CD3/5+ CD20/79a+	Langerin+	CD20/10/BCL6+ IGH/MYC+ BCL2/TdT-
	TdT/BCL2/MYC-	CD3/5-				
CD68	Histiocytes+	Histiocytes+	Histiocytes+	Histiocytes+	Histiocytes+	Histiocytes+
MIB-1	High+	High+	Low+	NA	NA	High+ (≥95%)
S-100	-	-	+	-	++	-
CD1a	-	-	-	-	++	-

節炎で特徴的な類上皮細胞やラングハンス型巨細胞は認められず、これらは否定された。バーキットリンパ腫は、出現細胞の主体が中型で好塩基性の細胞質を有し、ギムザ染色では多数の空胞を認める。核分裂像やアポトーシス像を多数認め、アポトーシスを起こした細胞が組織球に貪食される starry-sky 像が特徴である。また、免疫染色で CD10 が陽性、BCL-2 陰性、Ki-67 (MIB-1) 陽性率が 95% 以上である。本例は、臨床医により塗抹・湿固定後に提出されたためパパニコウ染色標本しか作製しておらず、ギムザ染色標本での考察はできなかったが、本例は細胞診の Papanicolaou 染色上でも典型的なバーキットリンパ腫に比較して多形性が強く、核片貪食組織球の出現は少ないため、バーキットリンパ腫は考えづらい細胞像であった。

Emperipolesis を呈する疾患として鑑別すべき Rosai-Dorfman 病は原因不明の腫瘍性組織球増殖性疾患であり、20 歳代までの若年男性で無痛性、両側性の頸部リンパ節症として発生することが多く、特徴的な組織所見は、病変リンパ洞内に組織球が高度に増殖し、組織球の細胞質に emperipolesis を認めることである<sup>8)</sup>。Emperipolesis とは、組織球の細胞膜陥没によって一見リンパ球が組織球の細胞質内に入り込んだかのようにみえる所見をいう<sup>9)</sup>。本例の標本中に emperipolesis 様所見を認めたが、Rosai-Dorfman 病の組織球は S-100 陽性、CD1a 陰性が特徴とされ、本例とは合致しない (Table 1)。また、本例では背景のリンパ球に異型を認めることから、同疾患は否定される。

本例で興味深かった点は、細胞診では顕著であった多核巨細胞が永久標本では迅速標本に比較して出現数が少なかったことである。ただし、迅速診断標本では、細胞診同様に組織球が多く認められたため、組織球の出現は局所的な所見であった可能性がある。本例では、穿刺吸引した検体を二枚のスライドガラスで短くすり合わせて標本作製された。Lopes らの報告では、emperipolesis は Rosai-Dorfman 病に限定されず非ホジキンリンパ腫などを含む他の疾患でも認められることがあるとされている<sup>10)</sup>。まれに悪性リンパ腫症例においても認められるが、組織球に取り込まれた

リンパ腫細胞には損傷の形跡がないことが、電子顕微鏡を用いて確認されている<sup>10)</sup>。森脇らの報告では、多核組織球の細胞質は泡沫状であり、これら泡沫状の空胞は滑面小胞体とリソソームに富んでおり異物の貪食に関与しているとされている<sup>11)</sup>。本例の細胞像でみられた emperipolesis 様所見を示す組織球内に取り込まれているリンパ球は小型で明らかな異型は認めなかった。ゆえに、本例でみられた多核巨細胞は非腫瘍性の組織球で、炎症に伴い誘導された多核組織球であった可能性が考えられる。本例では B 細胞性腫瘍であるにもかかわらず、TRB (TCR: T cell receptor) 遺伝子の monoclonal な再構成を認めた。PCR 法では、ウイルス感染などにより T 細胞の免疫応答が増強している場合、偽陽性となる場合もあること<sup>12)</sup>が報告されている。また、TCR 遺伝子再構成は T 細胞系列に限定した現象ではなく、B 細胞性腫瘍でも 2~10% の頻度で再構成を認めることが報告されている<sup>13)</sup>。本例は、EBER (ISH) 陰性であり明らかな Epstein-Barr ウイルス感染細胞は認められず、このどちらの理由によるのかは不明である。組織内に多核巨細胞が散見され炎症細胞が多く混在していたことから前者の理由、すなわち PCR 法における偽陽性の可能性がより強く考えられた。

## VI. 結 語

DLBCL 症例においても多数の多核巨細胞や Rosai-Dorfman 病に類似した emperipolesis 様所見を示す多核巨細胞が出現することがあることが示された。

本論文に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業などはありません。

本論文の要旨は第 58 回日本臨床細胞学会秋期大会 (2019 年 11 月、岡山) で発表した。

## Abstract

**Background** : We report a case of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), in which fine-needle aspiration cytology revealed a large number of multinucleated giant cells showing emperipolesis-like features.

**Case** : The patient was a male in his second decade of life who presented with a mass in the left neck that he had first noticed two months earlier. Findings of MRI and neck ultrasonography led to the suspected diagnosis of malignant lymphoma or schwannoma. Cytological examination revealed small- to large-sized atypical lymphocytes admixed with a large number of macrophages and multinucleated giant cells. The multinucleated cells showed intracytoplasmic inclusions containing lymphocytes, a finding that was considered as being emperipolesis-like. Similar to the cytological findings, intraoperative frozen section examination also revealed diffuse infiltration of small- to intermediate-sized lymphocytes admixed with macrophages and multinucleated giant cells. However, on permanent-section histopathology, while diffuse infiltration of lymphocytes was observed, histiocytes and multinucleated giant cells were indistinct. Immunohistochemically, the background atypical lymphocytes showed diffuse and strongly positive staining for CD 20, while the histiocytes and multinucleated giant cells showed negative staining for CD20, S-100 and CD1a, and positive staining for CD68 and CD163. Based on the findings, we made the final diagnosis of DLBCL with reactive infiltration of histiocytes and multinucleated giant cells showing emperipolesis-like features.

**Conclusion** : Multinucleated giant cells showing emperipolesis-like features is a rare, but possible finding in DLBCL.

## 文 献

- 1) 日本臨床細胞学会細胞診用語解説委員会, 編. 細胞診用語解説集. 日本臨床細胞学会 ; 2016 86. (<http://jscc.or.jp/wp-content/uploads/2015/05/kaisetsu.pdf>) 2020 年 4 月 1 日
- 2) 森脇昭介, 宇佐美孝子, 山本陽子, 山内政之, 村上和重. 各種多核巨細胞について—主として細胞診の立場から. 日臨細胞会誌 1976 ; 15 : 83-96.
- 3) 清水 宏. 2章皮膚病理組織学. あたらしい皮膚科学 第3版.

東京 : 中山書店 ; 2018 : 46-47.

- 4) Jaffe, R., Pileri, S. A., Facchetti, F., Jones, D. M., Jaffe, E. S. Histiocytic and dendritic cell neoplasms. Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., eds. The World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Lyon : IARC Press ; 2017. 466-472.
- 5) De Wolf-Peters, C., Delabie, J., Campo, E., Jaffe, E. S., Delsol, G. T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., eds. The World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Lyon : IARC Press ; 2017. 298-299.
- 6) Pittaluga, S., Jaffe, E. S. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. Haematologica 2010 ; 95 : 352-356.
- 7) 岸本浩次, 北村隆司, 鈴木孝夫, 増永敦子, 楯 玄秀, 光谷俊幸. 濾胞性リンパ腫 Grade 1 と反応性濾胞過形成との鑑別に関する検討—パバニコロウ染色, bcl-2 蛋白での比較を中心に—. 日臨細胞会誌 2005 ; 44 : 118-123.
- 8) Shi, Y., Griffin, A. C., Zhang, P. J. L., Palmer, J. N., Gupta, P. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman Disease) : A case report and review of 49 cases with fine needle aspiration cytology. Cytojournal 2011 ; 8 : 3.
- 9) 今井みどり, 藤田 勝, 松岡博美, 井上博文, 濱田香奈, 田中健大・ほか. 髄膜腫を疑われた Rosai-Dorfman disease の一例. 岡山県臨床細胞学会誌 2014 ; 33 : 42-45.
- 10) Lopes, L. F., Bacchi, M. M., Coelho, K. I., Filho, A. A., Bacchi, C. E. Emperipolesis in a case of B-cell lymphoma : a rare phenomenon outside of Rosai-Dorfman disease. An Diagnostic Pathol 2003 ; 7 : 310-313.
- 11) 森脇昭介, 山内政之, 宇佐美孝子, 山本陽子, 村上和重, 香川 久. 細胞質内の空胞について. 日臨細胞会誌 1980 ; 19 : 499-505.
- 12) 丸岡隼人. 造血器腫瘍における遺伝子検査の実際. 生物試料分析 2020 ; 43 : 289-299.
- 13) Szczepański, T., Langerak, A., Van Dongen, J., Van Krieken, J. H. Lymphoma with multi-gene rearrangement on the level of immunoglobulin heavy chain, light chain, and T-cell receptor beta chain. Am J Hematol 1998 ; 59 : 99-100.

## 症 例

## 肉腫成分を含んだ肺の混合型小細胞癌の1例

上田 香織<sup>1)</sup> 星 暢夫<sup>2)</sup> 佐々木 優<sup>1,3)</sup> 中野 公子<sup>1)</sup>  
 阿部 信<sup>2)</sup> 星 サユリ<sup>2)</sup> 平林かおる<sup>2)</sup>

地方独立行政法人栃木県立がんセンター検査技術科<sup>1)</sup>, 同 病理診断科<sup>2)</sup>,  
 栃木県県北健康福祉センター健康対策課・試験検査課<sup>3)</sup>

背景：混合型小細胞癌は、非小細胞性肺癌（non-small cell lung carcinoma：以下、NSCLC）の成分を含む小細胞癌の総称である。われわれはNSCLCの成分として癌肉腫成分からなる混合型小細胞癌の1例を経験したので報告する。

症例：50歳代、男性。血痰および咳嗽が出現し画像所見で右肺上葉に10 cm大の腫瘍を認めた。CTガイド下針生検にて肉腫様癌と診断されたため、右肺上葉切除+リンパ節郭清が施行された。切除検体の病理学的検索で腫瘍は癌肉腫を伴う混合型小細胞癌と診断された。同時に施行された切除腫瘍の捺印細胞診検体では多数の腺癌細胞、紡錘形間葉系異型細胞とともに少数の小細胞癌の細胞を確認した。

結論：細胞診断上、混合型小細胞癌を診断することは困難であるが、本例のような希少例を共有することが必要であると考えられた。

**Key words** : Lung, Imprint cytology, Combined small cell carcinoma, Carcinosarcoma, Transition

## I. はじめに

混合型小細胞癌は、非小細胞性肺癌（non-small cell lung carcinoma：以下、NSCLC）の成分を含む小細胞癌の総称であり、特に癌肉腫との合併はまれである。今回われわれは、NSCLCの成分として癌肉腫成分からなる混合型小細胞癌の1例を経験した。その捺印細胞像と組織像との対比について文献的考察を加えて報告する。

A case of combined small cell carcinoma of the lung with carcinosarcoma

Kaori UETA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Nobuo HOSHI<sup>2)</sup>, M. D., Masaru SASAKI<sup>1,3)</sup>, C. T., J. S. C., Kimiko NAKANO<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Makoto ABE<sup>2)</sup>, M. D., Sayuri HOSHI<sup>2)</sup>, M. D., Kaoru HIRABAYASHI<sup>2)</sup>, M. D.

<sup>1)</sup>Division of Clinical Laboratory, <sup>2)</sup>Division of Diagnostic Cytopathology, Tochigi Cancer Center

<sup>3)</sup>Division of Examination and Inspection, Northern Tochigi Prefectural Health and Welfare Services Center

論文別刷請求先 〒320-0834 栃木県宇都宮市陽南4の9の13

地方独立行政法人栃木県立がんセンター検査技術科 上田香織

令和3年1月15日受付

令和3年2月2日受理

## II. 症 例

症 例：50歳代。男性。

喫煙歴：20本/日。30年間。

家族歴および既往歴：特記事項なし。

現病歴：血痰および咳嗽が出現し、近医受診。CT検査で右肺に腫瘍を指摘され、当院呼吸器内科に紹介受診となった。造影CT検査では、右肺上葉背側に10 cm大の腫瘍性病変を認め（Photo. 1）、CTガイド下針生検では肉腫様癌と診断された。臨床的にリンパ節転移・遠隔転移は指摘できず、cT4N0M0、cStage IIIAの肺癌の診断のもと、右肺上葉切除およびND2a-2群までのリンパ節郭清が施行された。腫瘍は右肺上葉の大部分を占める大きさであったが、周囲臓器へは圧排所見のみであり、壁側胸膜の一部の癒着部位を合併切除し、葉切除は可能であった。この腫瘍部より捺印細胞診標本を作製した。

縦隔リンパ節に明らかな転移はなく、気管支断端・開胸時の胸腔内洗浄細胞診ともに陰性であった。

術後2ヵ月後よりシスプラチンとエトポシドによる化学

療法が施行され, 術後から 4 年 5 ヶ月の現在まで腫瘍の再発はない。

### III. 細胞学的所見

手術での摘出検体からの腫瘍部捺印標本からは, 次のような細胞像が観察された。

- ①強い壊死性背景に不整重積を伴う大小の集塊と結合性の低下を示す細胞集塊を多数認め, 集塊には間質を伴う乳頭状構造や腺腔様配列が観察された。核は類円形～短紡錘形で N/C 比が高く, 大小不同がみられた。核縁の肥厚があり, クロマチンが細顆粒状に増加していた。核小体は類円形で 1～数個みられた。細胞質はライトグリーンに泡沫状に淡染していた。以上より, 腺癌を考えた (Photo. 2a, b)。
  - ②集塊周囲の腺癌細胞に混じて, 短紡錘形～紡錘形細胞, オタマジャクシ様細胞が孤立散在性に確認された。核は単核ないし多核で類円形～紡錘形を呈していた。核形不整が目立たない細胞やくびれるような核形不整の著しい細胞まで観察され, 多彩な印象であった (Photo. 2c, d)。核クロマチンは微細顆粒状で, 核小体が肥大しており, 1～数個みられた。オタマジャクシ様細胞は, 多核で, 核が突出するような核偏在性を呈していた (Photo. 2e)。以上より, 間葉系異型細胞を考えた。
  - ③腺癌細胞, 間葉系異型細胞に混じて, リンパ球の 2～3 倍程度の小型類円形の異型細胞を小集塊, 孤立散在性に認めた。N/C 比は高いが, 細胞質は保たれている印象で, 細胞境界は比較的明瞭であった。核クロマチンは微細顆粒状よりは粗く, 細顆粒状の増加を認めた。クロマチン分布が軽度不均一な印象で, 核縁は軽度肥厚し, 核の崩壊や核線はみられないが, 一部小集塊に木目込み様配列を認めた。以上より, 小細胞癌を考えた (Photo. 2f)。
- また, ①～③の形態的特徴をあわせもつ分類不可能な中間的異型細胞も多数存在した。

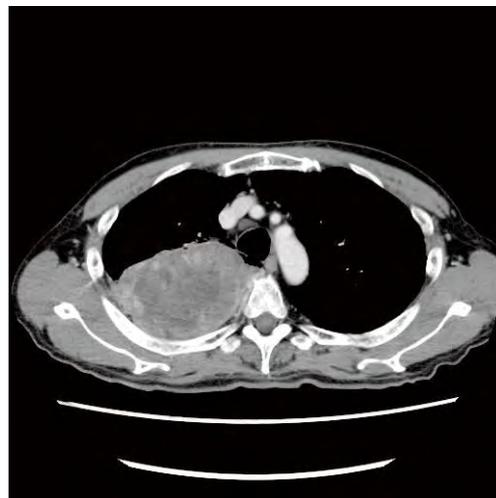
### IV. 病理学的所見

#### 1. 術前 CT ガイド下針生検 (Photo. 3)

腫瘍は上皮成分と粘液基質の目立つ間葉性成分とが混在していた。

上皮成分は, 異型の高度な高円柱上皮細胞の腺管状・乳頭状・充実増殖からなる腺癌であり, 核分裂像とアポトーシスも散在していた。癌細胞は濃染性核を有しており, N/C 比大で細胞の大小不同が目立った。

間葉性成分は粘液基質を背景に, 紡錘形ないし多角形の



**Photo. 1** Chest CT image showing a hypovascular mass with inner heterogeneity in the right upper lobe, measuring 10 cm in diameter.

腫瘍細胞が結合性を有さずに増生していた。腫瘍細胞には大小不同があり, 奇怪な核の大型多形細胞や多核の細胞も散見された。病巣内には核分裂像, アポトーシスが散見され, 肉腫様成分と考えた。明らかな異所性成分は認めなかった。

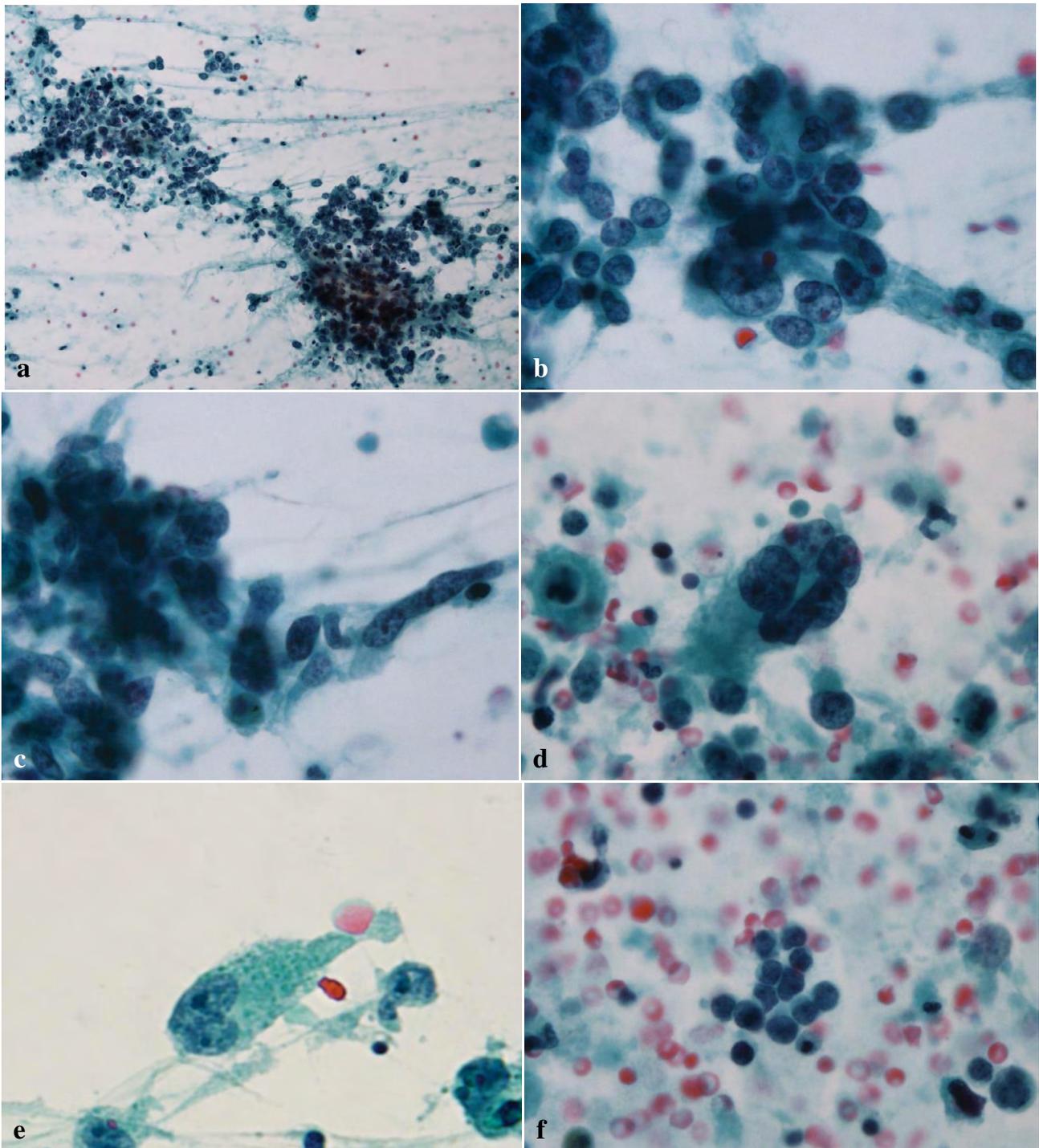
腺癌成分と肉腫様成分との境界部には両者の間に移行を認め, 以上の所見より肉腫様癌に相当し, 高度の細胞異型を示すことから多形癌ないし癌肉腫の可能性が考えられた。

#### 2. 切除検体の肉眼的所見

右上葉肺実質内には, 13×10×6 cm 大の灰白色調充実性腫瘍病変を認めた (Photo. 4)。腫瘍は膨張性発育を呈し, 内部に出血性壊死を伴っていた。壁側胸膜が合併切除されている部位もあったが, 肉眼的には胸膜浸潤は認めなかった。腫瘍に隣接する肺実質は黄色調で, 腫瘍の影響により炎症をきたしたと考えた。

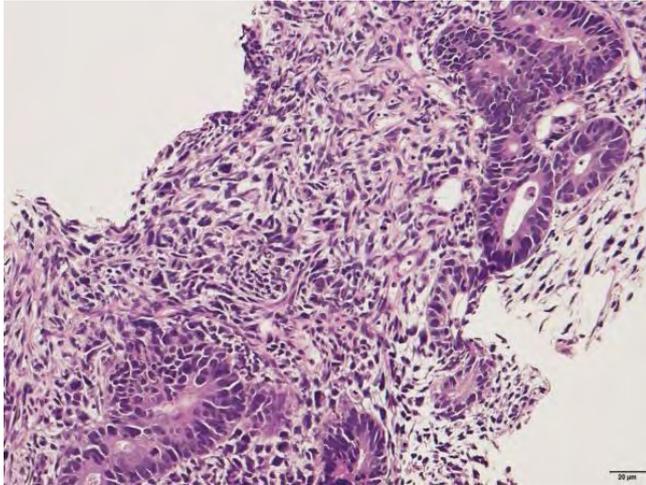
#### 3. 切除検体の組織学的所見

組織学的に腫瘍は癌腫成分と肉腫成分からなり, 多彩な像を呈していた。癌腫成分は核異型の高度な癌細胞が管腔状ないし充実性に増殖する腺癌病巣が主体であった (Photo. 5a)。一部には核クロマチン増の小型～中型の癌細胞が充実性に増殖する領域があり, 小細胞癌が示唆された (Photo. 5b)。一方で, 肉腫成分は紡錘形, 多角形の異型の高度な腫瘍細胞の増殖からなり (Photo. 5c), 横紋筋肉腫成分や軟骨肉腫成分の異所性成分も観察された (Photo. 5d, e)。腺癌および小細胞癌を含めた癌腫成分と肉腫成分の間には組織像の移行を認め (Photo. 5c), 各細胞成分とはっきりと鑑別しがたい中間的な細胞が多数出現していた。HE 所見からは小細胞癌を伴う癌肉腫に相当すると考えられた。



**Photo. 2** Imprint cytology of the right lung tumor. Tumor cells are seen agglomerated clustered or scattered in a necrotic background. The tumor cells contain hyperchromatic nuclei with a high nuclear cytoplasmic ratio (Pap. staining,  $\times 10$ ) (a). Some cells forming glandular structures (Pap. staining,  $\times 40$ ) (b). Loosely cohesive polygonal cells and spindle-shaped cells (Pap. staining,  $\times 100$ ) (c). Tumor cells showing polynuclear and hyperchromatic nuclei (Pap. staining,  $\times 10$ ) (d). Tumor cells show eccentrically located nucleus and abundant cytoplasm (Pap. staining,  $\times 80$ ) (e). Some small clusters of small atypical cells showing a high nuclear- cytoplasmic ratio, containing nuclei with a fine granular pattern of chromatin. Some of the tumor cells show nuclear molding (Pap. staining,  $\times 100$ ) (f).

免疫組織化学の結果を Table 1 に示した. 癌腫成分と肉腫成分の両成分に, CK (AE1/3), TTF-1, S-100 タンパク, Vimentin, EMA, CD56, Neuro filament が陽性を示し, CK20, chromogranin A は陰性であった. 癌腫成分のみに, CK7, CK (CAM5.2), Synaptophysin, E-cadherin が陽性であった. 特に小細胞癌を考える部位では, Synaptophysin,



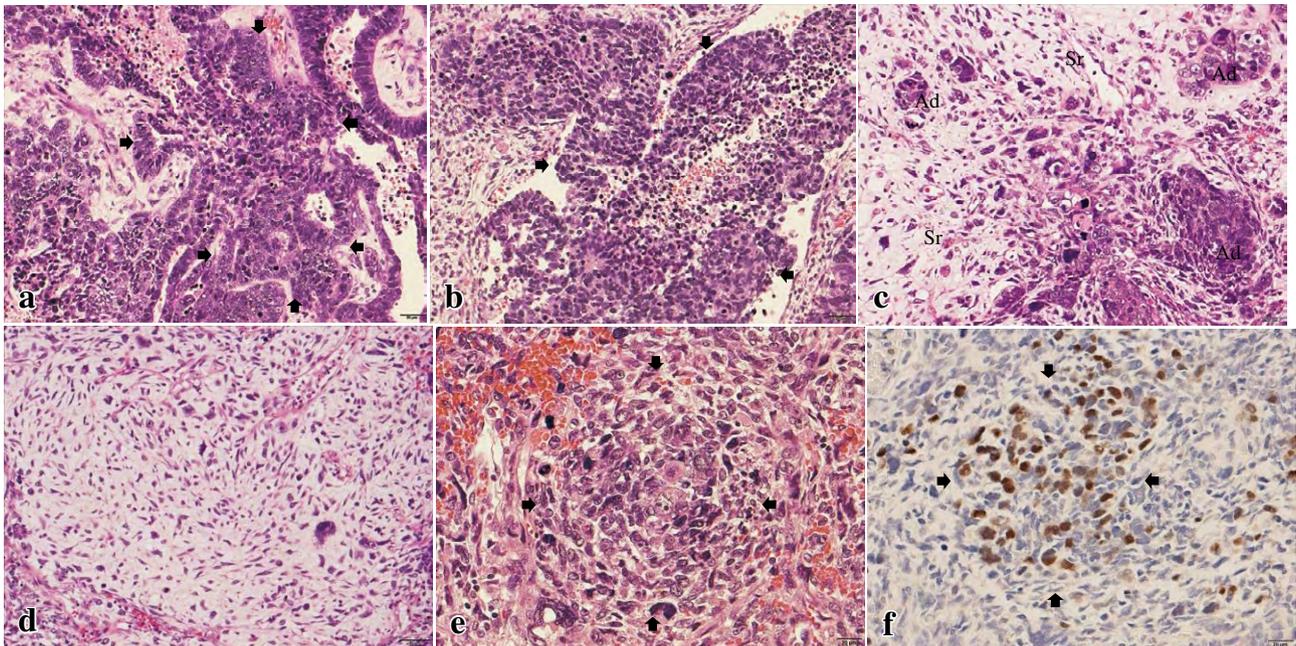
**Photo. 3** Histological findings of the lung tumor biopsy showing both carcinomatous and sarcomatous components. There is gradual transition between these components (H. E. staining,  $\times 20$ ).

Neuro filament が優位に陽性を示し, 神経内分泌系形質を確認した. 肉腫成分の一部には, Desmin, Myogenin に陽性を示す部位があり, 同部は HE 染色で横紋筋肉腫を考える部位と一致した (Photo. 5e, f). 癌腫成分と肉腫成分の移行部位では, 癌腫成分から肉腫成分への形態変化とともに, 上皮系マーカーの発現が低下し, 間葉系マーカーの発現が上昇している印象であった (Photo. 6).

多彩な組織像を呈する腫瘍であるが, 小細胞癌の成分が存在することを重視し, 最終診断は NSCLC の成分を癌肉



**Photo. 4** Macroscopic findings. Tan-to-grayish colored solid tumor in the upper lobe of the right lung.



**Photo. 5** Histological findings of the lung tumor : Formation of gland-like structures is seen (H. E. staining,  $\times 10$ ) (a : arrows), proliferation of tumor cells in a solid pattern (H. E. staining,  $\times 10$ ) (b : arrows), and a sarcomatoid growth pattern (H. E. staining,  $\times 10$ ) (c). Note the transitional zone between the carcinomatous (Ad) and sarcomatoid components (Sr) in the tumor. In addition, the tumor shows a chondrosarcoma component (H. E. staining,  $\times 20$ ) (d) and a rhabdomyosarcoma component (H. E. staining,  $\times 20$ ) (e). The striated rhabdomyoblasts specifically show positive staining for myogenin (IHC, Myogenin,  $\times 20$ ) (f).

**Table 1** Immunohistochemical analysis results

Antibody	Adeno carcinoma	Small cell carcinoma	Sarcomatoid component
CK AE1/3	+	+/-	+/-
CK 7	+	+/-	-
CK 20	-	-	-
CAM5.2	+	+/-	-
TTF-1	+	+/-	+
Synaptophysin	+	+	-
CD56	+	+	+
Neuro filament	+	+	+
Chromogranin A	-	-	-
S-100 protein	+	-	+/-
EMA	+	+/-	+
Vimentin	+	+	+
E-cadherin	+	-	-
Desmin	-	-	+/- *
Myogenin	-	-	+/- *

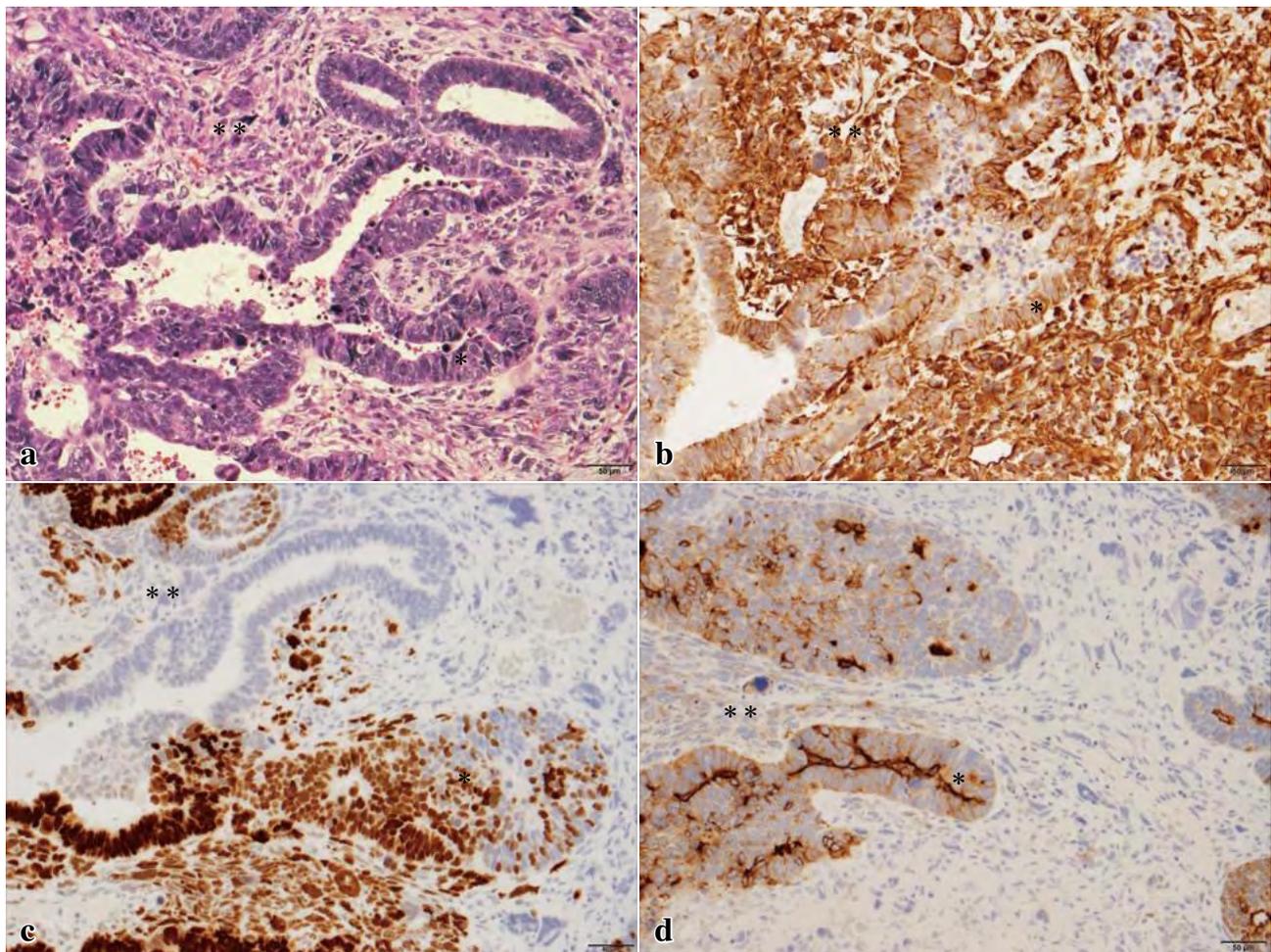
+ : positive cells > 5% ; +/- : 5% ≥ , > 0% ; - : 0%

\*positive reactions only in rhabdomyoblasts

腫とする混合型小細胞癌とした。隔清されたリンパ節には癌の転移、遠隔転移は認めなかった。胸膜浸潤、脈管侵襲はなく、リンパ管侵襲を中等度、静脈侵襲を軽度認めた。UICC TNM 分類は pT4N0M0, pStage IIIA であった。

## V. 考 察

小細胞肺癌は肺癌の 15~20% を占め、そのうち、混合型小細胞癌は 2~5% といわれる<sup>1)</sup>。肉腫を含んだ報告例はきわめてまれである。これまでの報告では<sup>2~5)</sup>、中高年の男性、長期間にわたる喫煙歴があり、部位では肺中葉より肺末梢に多く発症している。多くの症例は 2 年以内に原病により死に至っている。予後に関する外科的因子としては腫瘍の大きさが 6 cm 以上、転移の存在、完全切除の有無が挙げられている。また、混合型小細胞癌の予後は、純粋な小細胞癌との有意差はないとの報告があり<sup>6,7)</sup>、治療法については小細胞癌に準じている<sup>8)</sup>。



**Photo. 6** Transitional zone between the carcinomatous (\*) and sarcomatoid components (\*\*) in the tumor.

(a) H. E. staining, ×20, and IHCs, ×20 ; (b) Vimentin, (c) E-cadherin, (d) EMA. Note that the expression patterns of the epithelial and mesenchymal markers change from the sarcoma to the carcinoma component.

本例については、外科的切除後、小細胞癌に準じた化学療法が施行されたが、術後 4 年 5 ヶ月経過後も再発や転移の徴候は認めていないことについては興味深い。本例は手術時にリンパ節転移や遠隔転移がなく、かつ完全切除ができたことが長期生存の要因と考えられた。調べたかぎり、混合型小細胞癌に言及した予後に関する分子発現についての報告はなかった。近年、癌の進展・増殖に ALDH1 や Podoplanin の癌幹細胞マーカーの発現の有無<sup>9,10)</sup>が予後に関与していることが明らかとなっており、本例についても関与しているのかもしれない。今後、類似症例の蓄積および比較解析が必要であろう。

本例の組織像について、術前の CT ガイド下針生検では、腺癌成分と肉腫成分が混在し、多彩な印象であったが、小細胞癌成分は観察されず、肉腫様癌とした。異所性成分や小細胞癌成分の増殖巣は限局的であり、穿刺針での採取ができなかったためと考えられた。実際、気管支鏡検査などによる微小検体では混合型小細胞癌との診断率が低く、手術や剖検にて診断されることが多いとされている<sup>4)</sup>。このような採取部位や採取法による検体採取の問題は、細胞診断においても起こりうることだと予想される。

切除検体の組織診では、癌腫成分は腺癌病巣が主体であり、一部には小細胞癌が観察された。肉腫成分は、紡錘形細胞のほか、横紋筋肉腫、軟骨肉腫といった異所性成分も観察された。癌腫成分と肉腫成分間は移行的であり、両者のいずれに相当するか鑑別の難しい中間的な腫瘍成分が多数存在していた。免疫組織化学では、移行像が確認された部位について、癌腫成分から肉腫成分への形態変化とともに、上皮系マーカーの発現が低下し、間葉系マーカーの発現が上昇している印象であった。この組織学的特徴は捺印細胞像にも反映されており、腺癌の特徴を呈した集塊や肉腫の特徴を呈した異型の高度な細胞が出現していたが、両成分の特徴が混在した異型細胞も多数認められ、細胞の鑑別に苦慮した。捺印細胞診で認められた小細胞癌においても、核クロマチンは微細顆粒状で密に充満しており、核縁はごく薄く観察される小細胞癌特有の核所見<sup>1,11)</sup>と比べて、核クロマチンは微細顆粒状というよりはやや粗く、クロマチン分布は軽度不均一な印象であった。核縁は薄いというよりは軽度の肥厚が認められ、通常の小細胞癌よりも目立っていた。本例は癌肉腫に伴った癌細胞であり、細胞分化に異常を生じて、それが細胞形態に反映されたのではないかと推察された。

細胞学的鑑別診断として、癌肉腫成分に着目した場合、多形癌や肺芽腫が挙げられる。本例では、肉腫成分に異所性成分を認めたこと、癌腫成分の異型が高度であり、かつ、胎児型の成分を認めなかったことから、仮に小細胞癌成分

が認められなかった場合でも、いずれの病変とも鑑別できると考えられた。小細胞癌成分についての細胞学的鑑別は、悪性リンパ腫、カルチノイド、悪性黒色腫、滑膜肉腫などが考えられる。本例の小細胞癌は、クロマチンパターンが神経内分泌系を考える様相であったこと、木目込み様の上皮性細胞配列より、ごく少数であったが小細胞癌と特定することは可能と考えた。WHO 分類によると、癌肉腫において、小細胞癌成分を認めた際には癌肉腫ではなく、混合型小細胞癌と分類すべきであると定義されている<sup>12)</sup>。このことから、細胞診断にて癌腫とも肉腫とも言いきれない性質で、高度な異型細胞が出現した際には、混合型小細胞癌の可能性についても考慮し、小細胞癌成分の存在の有無を注意深く観察する必要があるといえる。

混合型小細胞癌において、困難ではあるが、特に治療前に小細胞癌成分の有無を明らかにすることは、治療法の選択や予後の推定に影響することから、その診断についての意義は高いと考えられた。

今回、肉腫成分を含んだ混合型小細胞癌の 1 例を経験した。本例のような希少例を共有することは診断および治療の質を高めるうえで必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。

謝辞：本症例について、臨床情報を提供していただきました当センター呼吸器内科 杉山智英先生、当センター呼吸器外科 中原理恵先生、松隈治久先生に深謝いたします。

## Abstract

**Background** : Combined small cell carcinoma is the generic term used to refer to small cell carcinoma occurring concomitantly with NSCLC, and small cell carcinoma occurring concomitantly with carcinosarcoma is rare. Herein, we report a case of combined small cell carcinoma of the lung with carcinosarcoma.

**Case** : The patient, in his 50 s, presented with bloody sputum and cough, and imaging chest computed tomography (CT) a 10 cm-sized tumor in the right upper lobe. Biopsy suggested the diagnosis of sarcomatoid carcinoma, and lobectomy was performed. Histopathology of the resected tumor revealed the diagnosis of combined small cell carcinoma with carcinosarcoma. Imprint cytology revealed adenocarcinoma cells, spindle-shaped mesenchymal cells, and a small number of small cell carcinoma cells.

**Conclusion** : It is difficult to make a diagnosis of combined small cell carcinoma by cytology alone. It is necessary to accumulate cytological data from these rare cases to enable cytological diagnosis.

## 文 献

- 1) 特定非営利活動法人 日本肺癌学会, 編. 臨床・病理 肺癌 取扱い規約 第8版補訂版. 東京: 金原出版: 2021.
- 2) Noma, D., Morohoshi, T., Adachi, H., Natsume, I., Ookouchi, M., Masuda, M., et al. A resected case of combined small cell lung carcinoma with carcinosarcoma. *Pathol Int* 2015 ; 65 : 332-334.
- 3) 林 諭史, 北田正博, 小沢恵介, 佐藤一博, 徳差良彦, 三代川齊之. 神経内分泌形質を有する腺癌を合併した肺混合型小細胞癌の1例. *肺癌* 2009 ; 49 : 268-272.
- 4) 山根真由香, 大谷俊人, 大成洋二郎. 横紋筋肉腫の混在を有した混合型小細胞肺癌の1例. *肺癌* 2017 ; 57 : 320-324.
- 5) 高山裕介, 江川博彌, 中村有美, 菅原文博, 向田秀則, 金子真弓. 多彩な組織像を呈した肺癌肉腫の1例. *肺癌* 2010 ; 50 : 151-156.
- 6) Nicholson, S. A., Beasley, M. B., Brambilla, E., Hasleton, P. S., Colby, T. V., Sheppard, M. N., et al. Small cell lung carcinoma (SCLC) : a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* 2002 ; 26 : 1184-1197.
- 7) Zhao, X., McCutcheon, J. N., Kallakury, B., Chahine, J. J., Pratt, D., Raffeld, M., et al. Combined small cell carcinoma of the Lung : Is it a single entity? *J Thorac Oncol* 2017 ; 13 (2) : 237-245.
- 8) 特定非営利活動法人 日本肺癌学会, 編. 肺癌診療ガイドライン 2019年度版. 東京: 金原出版: 2019.
- 9) Morise, M., Hishida, T., Takahashi, A., Yoshida, J., Ohe, Y., Nagai, K., et al. Clinicopathological significance of cancer stem-like cell markers in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015 ; 141 : 2121-2130.
- 10) Takahashi, A., Ishii, G., Kinoshita, T., Yoshida, T., Umemura, S., Hishida, T., et al. Identification of prognostic immunophenotypic features in cancer stromal cells of high-grade neuroendocrine carcinomas of the lung. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013 ; 139 : 1869-1878.
- 11) 坂本穆彦. 細胞診を学ぶ人のために 第5版. 東京: 医学書院: 2011. 188-189.
- 12) Borczuk, A. C., Dacic, S. World Health Organization Classification of Tumours 5<sup>th</sup> Edition Thoracic Tumours. Lyon : Omnibook : 2021.

## 症 例

前立腺癌の内分泌療法中に尿中に腫瘍細胞が  
出現した前立腺小細胞癌の1例

中村 千秋<sup>1)</sup> 湯浅 瑛介<sup>1)</sup> 佐々木智子<sup>1)</sup> 村石 佳重<sup>1)</sup>  
 藤田 正志<sup>1)</sup> 横内 幸<sup>1)</sup> 大原関利章<sup>1)</sup> 高橋 啓<sup>1)</sup>  
 竹内 康晴<sup>2)</sup>

東邦大学医療センター大橋病院病院病理部/病理診断科<sup>1)</sup>, 同 泌尿器科<sup>2)</sup>

背景：前立腺小細胞癌は発生頻度の低い腫瘍で、腫瘍細胞が尿中に出現することはさらにまれである。今回、前立腺癌に対する内分泌療法中に尿中に小細胞癌を疑う異型細胞を認め、前立腺原発小細胞癌と診断された症例を経験した。

症例：60歳代、男性。近医でPSA高値、画像所見から前立腺癌と診断され、当院にて内分泌療法が開始された。13ヵ月間内分泌療法が施行された結果、PSA値は低下し、画像上も前立腺原発巣、転移巣ともに縮小・消失した。24ヵ月後、尿細胞診で小細胞癌を疑う異型細胞を認めたため前立腺生検が施行され、小細胞癌と診断された。尿細胞診像は、きれいな背景に小型でN/C比の高い異型細胞が孤立散在性あるいは集塊で出現していた。核は類円形から不整形を呈し、増量した顆粒状クロマチンを有していた。一部には変性を伴った核濃染性の細胞も認められた。集塊には木目込み配列やロゼット様構造が観察された。

結論：前立腺癌に対する内分泌療法中に、尿細胞診でN/C比の高い異型細胞を認めた場合、前立腺癌の形質転換を疑い小細胞癌を考慮することが重要である。

**Key words** : Small cell carcinoma, Prostate, Urine, Cytology, Case report

## I. はじめに

前立腺原発の小細胞癌は前立腺腫瘍の0.5~2%を占めるまれな腫瘍である<sup>1,2)</sup>。尿中に前立腺癌細胞が出現する頻度

は低いが、小細胞癌の腫瘍細胞が尿中に出現した報告はさらに少ない<sup>3)</sup>。今回、前立腺癌に対する内分泌療法によりPSA値が低下し腫瘍縮小効果が得られたものの、経過中に尿中に前立腺小細胞癌細胞が出現した一例を経験したので、文献との比較を交え報告する。

## II. 症 例

症 例：60歳代、男性。

経 過：X年3月、尿閉にて近医受診。超音波検査で前立腺内部は不均一で辺縁不整であり、PSAは高値で前立腺癌が疑われたため、翌4月に当院を受診した。受診時、PSA 3159ng/ml、CTにて前立腺腫大、肝・肺・骨髄転移、骨盤内リンパ節転移が認められた。生検は拒否されたため、臨床的に前立腺癌と診断し内分泌療法が開始された。同時期に採取された尿細胞診では異型細胞は観察されなかった。

Small cell carcinoma of the prostate—A case report, with a review of the literature—

Chiaki NAKAMURA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Yousuke YUASA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Tomoko SASAKI<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Yoshie MURAISHI<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Masashi FUJITA<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Yuki YOKOUCHI<sup>1)</sup>, M. D., Toshiaki OHARASEKI<sup>1)</sup>, M. D., Kei TAKAHASHI<sup>1)</sup>, M. D., Yasuharu TAKEUCHI<sup>2)</sup>, M. D.

<sup>1)</sup>Department of Pathology, <sup>2)</sup>Department of Urology, Toho University Ohashi Medical Center

論文別刷請求先 〒153-8515 東京都目黒区大橋2の22の36 東邦大学医療センター大橋病院病院病理部/病理診断科 中村千秋

令和3年3月2日受付

令和3年3月2日受理

X+1年2月PSA値が再上昇したためホルモン抵抗性前立腺癌と診断され治療薬が変更された。この結果、前立腺原発巣と肝転移巣は縮小、骨盤内リンパ節転移はほぼ消失し肺結節も消失した。同年9月の定期検査においてもPSA 0.72 ng/ml、前立腺、肝転移巣、肺結節、骨盤内リンパ節転移巣は縮小あるいは消失したままであった。しかし、X+2年1月、顕微鏡的血尿と排尿時痛があり、尿細胞診で小細胞癌を疑う異型細胞を認めたため、精査を臨床医に依頼したところNSE 68.5ng/ml、Pro-GRP 677.0ng/mlと腫瘍マーカーの上昇をみ、前立腺生検で小細胞癌と組織診断された。この際、CTにて前立腺腫大、膀胱壁・精嚢浸潤、



**Photo. 1** Computed-tomographic image.  
A mass lesion showing inhomogeneous contrast enhancement is observed in the prostate.

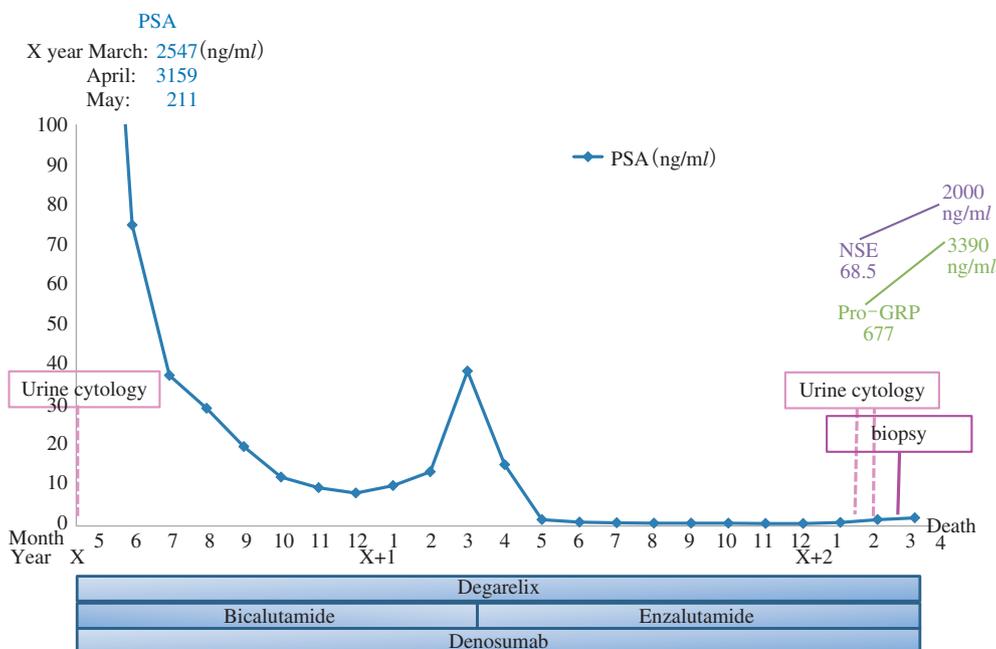
骨盤内リンパ節腫大を認めたが (Photo. 1)、新たな肺の病変は認めなかった。腫瘍は急速に増大し、当院受診24ヵ月後のX+2年4月に全身状態悪化で永眠された。臨床経過を Fig. 1 に示す。

### III. 尿の細胞学的所見 (X+2年1月)

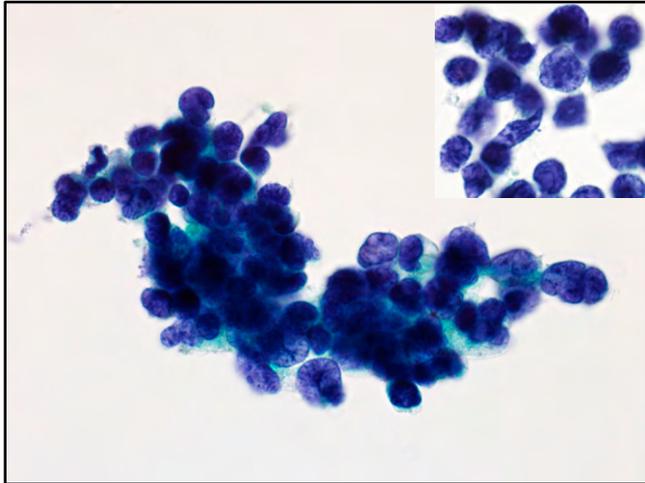
自然尿に対して1500rpm5分間遠心後、沈渣に10%アルブミンを一滴加え再度遠心、シランコーティングされたスライドガラスに塗抹し、95%エタノールで固定後Papanicolaou染色を施した。きれいな背景にN/C比がきわめて高い裸核様細胞が観察された。核は小型・類円形で、一部の細胞にくびれが認められた。核クロマチンは増量し顆粒状で、結合性のある集塊や木目込み配列、索状配列を示し、ロゼット様構造も伴っていた。その一方、変性を伴った孤立散在性の細胞や結合性の緩い細胞も認められた (Photo. 2, 3)。また、通常型の前立腺癌細胞や尿路上皮癌細胞を思わせる異型細胞の出現は認めなかった。

### IV. 針生検時の病理組織学的所見

6本の針生検された前立腺組織が採取された。壊死を伴う腫瘍であり、クロマチンに富む裸核状の類円形腫瘍細胞がシート状あるいは索状の増殖を示した。多数の核分裂像を伴いロゼット構造も観察された (Photo. 4)。免疫組織学的検索にてChromogranin A, Synaptophysin, CD56が



**Fig. 1** Clinical course and PSA serum level



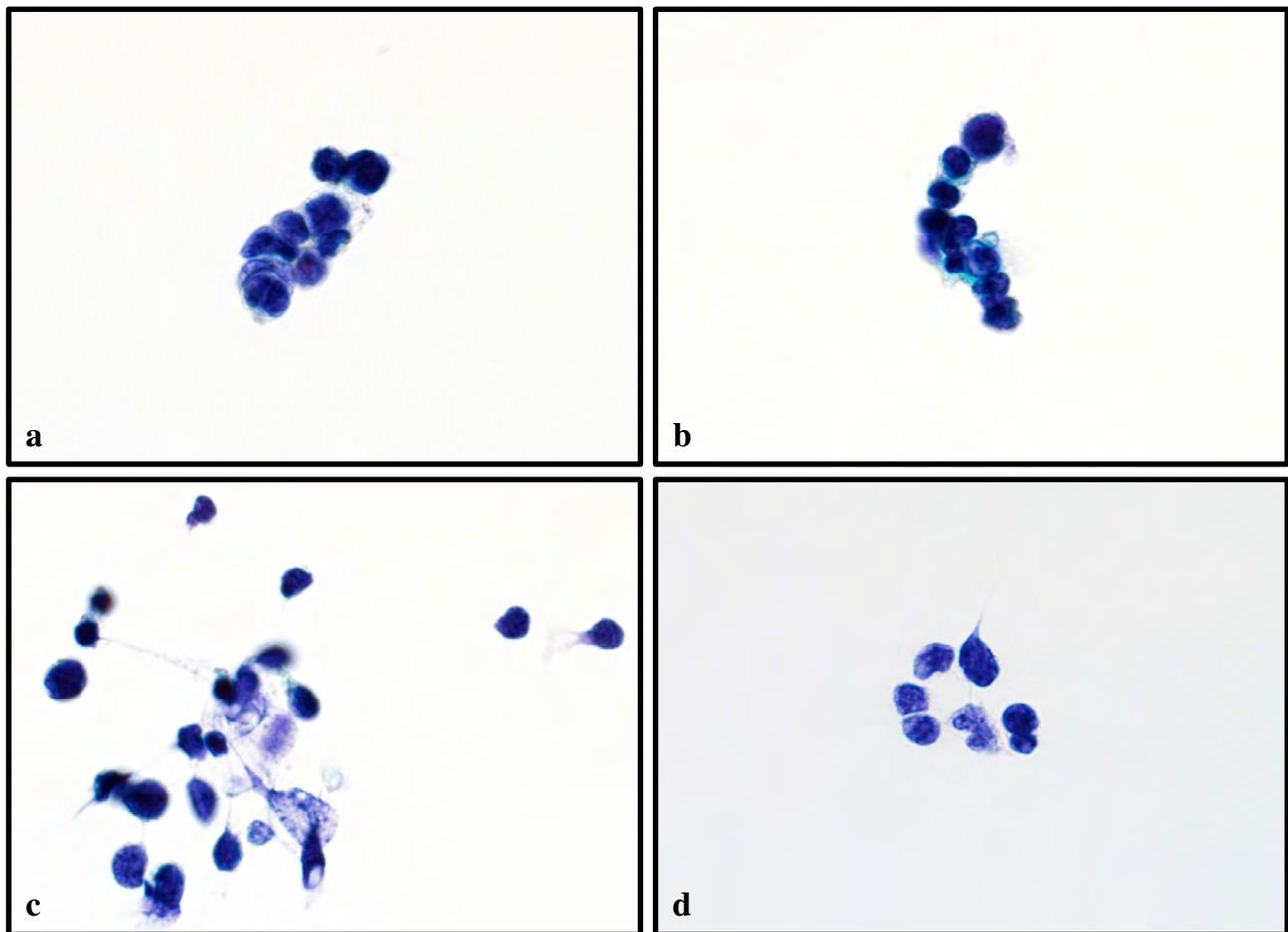
**Photo. 2** Urinary cytology (Pap. Staining,  $\times 100$ ).  
Tight aggregates of small atypical cells containing hyperchromatic and round nuclei, with scant cytoplasm. Some tumor cells arranged in a rosette-like pattern.

れも陽性であったが, PSA, PSAP ともに陽性と判定された腫瘍細胞は見いだせなかった (Photo. 5). 以上より, 前立腺原発の小細胞癌と診断した.

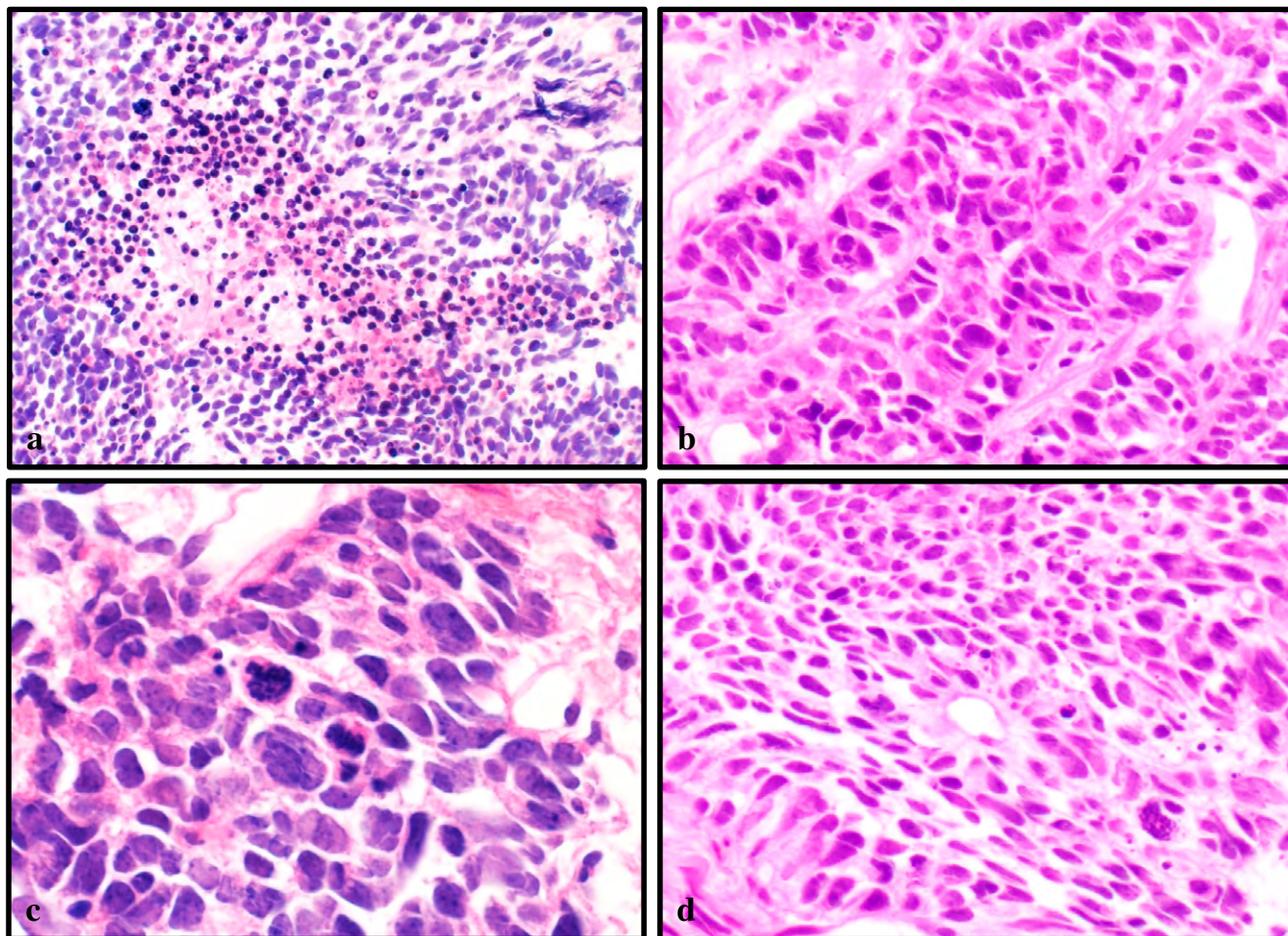
## V. 考 察

前立腺原発小細胞癌は 1977 年に Wenk らによりはじめて報告された腫瘍であり<sup>4)</sup>, 全前立腺腫瘍の 0.5~2%<sup>1,2)</sup>を占めるに過ぎないまれな腫瘍である.

本邦において 2008~2017 年の 10 年間に報告された前立腺小細胞癌を医中誌から検索したところ 56 例を抽出したので, 自験例と既報告例との臨床病理学的な比較検討を試みた (Table 1). 文献的に腺癌診断後に小細胞癌が発見され, 腺癌から小細胞癌への形質転換が疑われた症例は 56 例中 29 例 (52%) と過半数を占めていた. 一方, 初回診断時に腺癌と小細胞癌の両者が確認されたのは 7 例 (12%), 当初から小細胞癌と診断されていた症例は 20 例 (36%) で



**Photo. 3** Urinary cytology (Pap. Staining,  $\times 100$ ).  
Tumor cells in small aggregates with a molding pattern (a), single-file arrangement (b), isolated, scattered pattern (c), and loosely cohesive arrangement (d).



**Photo. 4** Histological findings of needle biopsy of the prostate (HE ;Staining, a,  $\times 20$  ; b,  $\times 40$  ; c,  $\times 60$  ; d,  $\times 40$ ).

The tumor cells show necrosis (a), a trabecular arrangement of the tumor cells (b), mitotic figures (c), and cell forming rosette-like patterns (d).

あった。形質転換症例における腺癌の診断から小細胞癌と診断されるまでの期間は2~128ヵ月(平均36.2ヵ月)とさまざまであり、腺癌に対する内分泌療法後長期間を経て形質転換は生じうることを知っておく必要がある。本例について考察すると、PSA異常高値から前立腺癌と診断された際に小細胞癌成分が併存していたか否かについては臨床的、病理学的検索ともに確認できていない。この一方、22ヵ月後に、血尿を契機に小細胞癌の腫瘍細胞が尿中に出現したのが確認されたときに生検にて腺癌成分を見いだすことはできなかった。したがって、本例では腺癌から小細胞癌へ形質転換した可能性に加え、発症時から腺癌と小細胞癌とが併存していた可能性を否定できない。しかし、前立腺癌の臨床診断後も22ヵ月間にわたり内分泌療法のみで腫瘍がコントロールされていたのに対し、小細胞癌が確認されてからはわずか3ヵ月で全身転移をきたし死に至った経過から、当初から悪性度の高い小細胞癌が存在したとするよりも腺癌の経過中に小細胞癌へと形質転換した可能

性が強く考えられた。

次に、PSA値の推移について、本例は初診時PSAが異常高値を示したものの、内分泌療法によりPSA低値状態が持続し、小細胞癌診断時にもPSAは基準値以下であった。形質転換した29例中内分泌療法の記載があったのは20例で、このうち15例は内分泌療法によりPSAが低下し、小細胞癌と診断されてからも基準値以下を示したままであった。一方、腺癌と小細胞癌の合併例で内分泌療法の記載があった4例中3例でPSAは基準値以下であった。さらに、診断時に小細胞癌のみが観察された20例においては13例でPSAは基準値以下であった。このように前立腺癌の治療後にPSAによる経過観察を行っても小細胞癌を早期発見することは困難な場合が多いと考えられる。また、本例は臨床的にホルモン抵抗性腺癌とされたが、腺癌に対する内分泌療法を行った20報告例中、ホルモン抵抗性腺癌の記載があったのは5例(25%)<sup>5)</sup>であった。ホルモン抵抗性腺癌の10~20%に小細胞癌をみたとの組織学的報告もあり<sup>6,7)</sup>、ホ

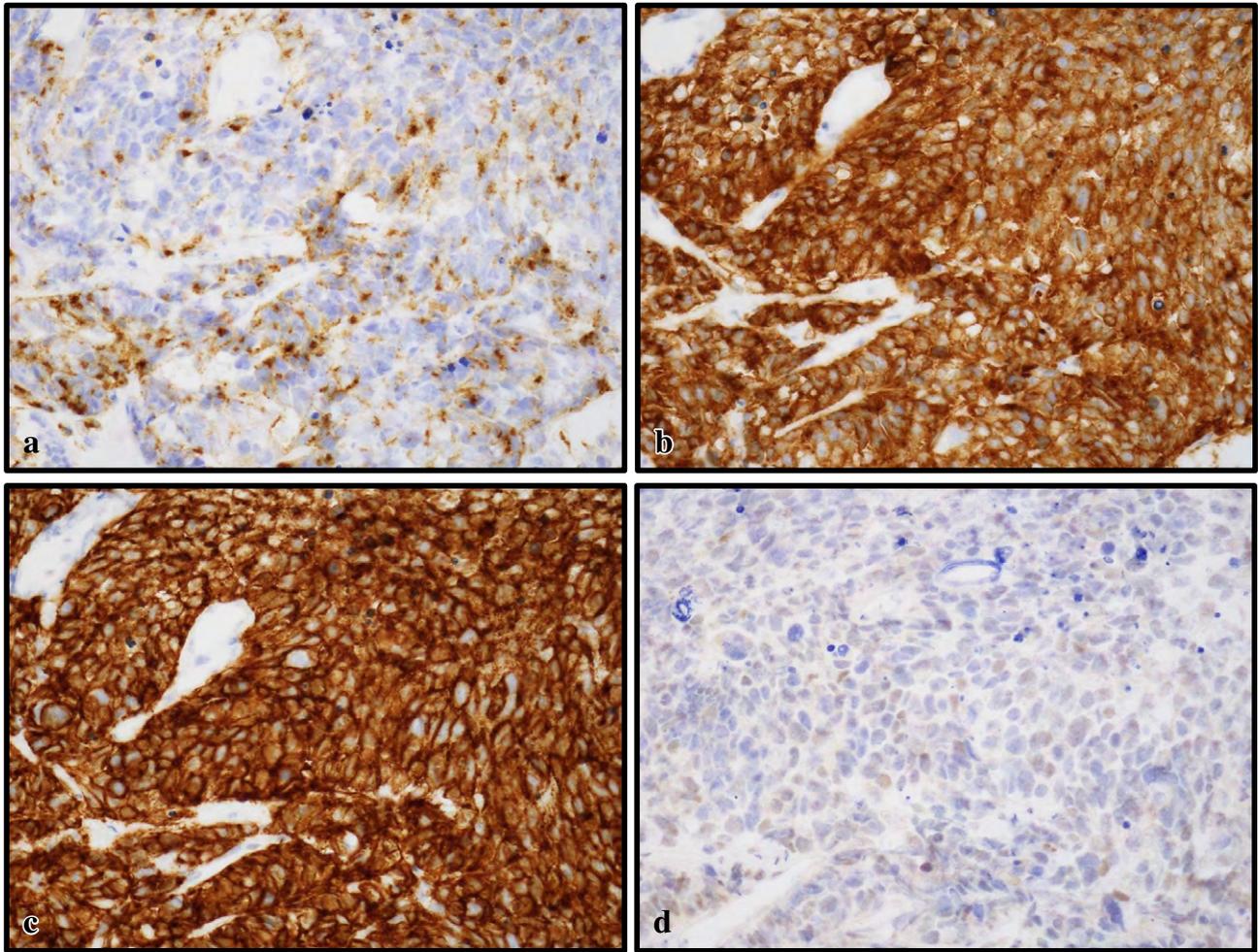


Photo. 5 Immunohistochemical findings (×40).

Tumor cells showed focally positive staining for chromogranin A (a) and diffusely positive staining for synaptophysin (b) and CD56 (c), but negative staining for PSA (d).

ホルモン抵抗性腺癌の場合には経過中に小細胞癌へと形質転換するリスクが高い可能性がある。

小細胞癌と診断されてから死亡に至る期間を報告から検討したところ、1 ヶ月で死に至った症例が存在する一方で長期生存例が少なからず存在した。しかし、臨床研究報告では神経内分泌分化を示す前立腺癌はきわめて予後不良とするものが多い<sup>2)</sup>。この乖離は症例報告の多くは治療が奏功し長期生存が得られたことを発表の趣旨としてなされていたために生じたものと推測した。

最後に、前立腺癌細胞が尿中に出現する頻度は7.4%との報告<sup>3)</sup>がある。一方、前立腺小細胞癌細胞が尿中に出現した症例は56例中4例(7%)で、両腫瘍の尿中腫瘍細胞出現頻度に大きな差はなかった<sup>8,9)</sup>。しかしながら、前立腺小細胞癌がまれであるため、日常診断業務で尿中に出現した腫瘍細胞をみる機会はきわめてまれである。小細胞癌の細胞診像は壊死性背景に、N/C比が著しく高く顆粒状クロ

マチンが著明に増加した核を有する異型細胞が相互圧排像やロゼット様配列、索状配列を呈するのを特徴とする<sup>10)</sup>。本例の尿細胞診像は小細胞癌に特徴的な所見が観察された一方で、きれいな背景に核クロマチンが不明瞭で濃染性の著しい細胞が結合性乏しく孤立散在性に出現しており、尿路上皮癌との鑑別を要した。これはTollら<sup>11)</sup>の尿中に出現した小細胞癌の細胞診像と一致しており、核クロマチンが不明瞭であった点や腫瘍細胞が孤立散在性に出現した点は、尿に曝露され尿中に浮遊した腫瘍細胞に細胞変性が増加し結合性が弱くなったことに起因すると推測される。

鑑別診断に関して、本尿細胞像の特徴的な配列と細胞所見から小細胞癌の診断は比較的容易である。しかしながら、その細胞像から前立腺原発か膀胱原発か肺原発かの鑑別は困難であるため、臨床情報を踏まえ原発巣を鑑別する必要がある。本例では尿細胞診にて小細胞癌を確認したが、このとき前立腺癌、尿路上皮癌いずれの成分も認めな

**Table 1** Fifty-six cases of small cell carcinoma of the prostate reported in Japan from 2008 through 2017.

	Age	Histological type of the prostatic cancer at the first visit	Metastatic site at the first visit	Changes of the serum PSA level (ng/ml) (month)	Hormon resistance	Interval (month)	Urinary cytology	Interval from diagnosis of SCC to death (month)	Treatment
1	76	Adeno	bone	403→0.172 (34)		34		27	endocrine therapy
2	84	Adeno		high level→0.843 (115)		93		17	endocrine therapy
3	51	Adeno	bone	295.7→4.68 (2)→43.35 (8)	○	2		12	endocrine therapy
4	74	Adeno		48.53→0.01 (31)		31		1	endocrine therapy
5	72	Adeno	LN	13.2→0.07 (13)→2.40 (33)		45	Class V	5	endocrine therapy
6	69	Adeno	bone, LN, seminal gland	352→0.2 (8)		25		41	endocrine therapy
7	72	Adeno	bone, LN	9140→34.4 (7)	○	7		alive at the 22nd month	endocrine therapy
8	80	Adeno	none	8.5→0.06→0.524 (21)		21		3	endocrine therapy
9	71	Adeno		226→0.021 (19)		34		alive at the 9th month	endocrine therapy
10	59	Adeno	none	high level→5.61		14		25	endocrine therapy
11	78	Adeno		5.2→0.07 (3)	○	3		7	endocrine therapy
12	72	Adeno		79.4→1.552	○	22		alive at the 8th month	endocrine therapy
13	73	Adeno	none	40→1.536 (6)→increasing (10)→3.637 (50)	○	50		0.5	endocrine therapy
14	78	Adeno	bone	65.9→0.14→0.09 (65)		65		4	endocrine therapy
15	78	Adeno	none	16.13→1.04 (43)		43		3	endocrine therapy
16	74	Adeno	none	112.58→stable		34		alive at the 7th month	endocrine therapy
17	53	Adeno	LN	256.9→normal range		18		13	endocrine therapy
18	59	Adeno	bone, lung	5.61				not described	endocrine therapy
19	60	Adeno	bone	11.5→0.01		28		6	endocrine therapy + surgical castration
20	72	Adeno	bone	56.4→5.592 (70)→2→4.04		87		alive	endocrine therapy + surgical castration
21	62	Adeno	bone, LN, lung	69→0.036		69		not described	
22	66	Adeno	bone, LN, lung, adrenal	10.4→0.026		128		not described	
23	64	Adeno	bone, LN	15.2→5.8		16		not described	
24	75	Adeno	lung	20.6→9.2		23		not described	
25	71	Adeno	LN	128→12.1		41		not described	
26	53	Adeno	bone	high level→0.32		17		13	
27	76	Adeno	bone, lung, liver	high level→0.46		17		15	
28	68	Adeno	bone	high level→1.75		9		5	
29	78	Adeno	none	51.941→0.1		39		alive at the 15th month	
30	76	Adeno + SCC	LN	26→0.61 (2)				alive at the 10th month	endocrine therapy
31	61	Adeno + SCC	bone	0.42→15 (5)			Class III	38	endocrine therapy
32	65	Adeno + SCC	bone, LN, liver	176.77→decreasing (3)				alive at the 12th month	endocrine therapy
33	55	Adeno + SCC	bone	7.8→0.6 (7)				46	endocrine therapy + chemotherapy
34	63	Adeno + NEC	none	4.5→4.8				not described	
35	66	Adeno + NEC	LN, lung	7.5				not described	
36	66	Adeno + NEC	bone, LN	397.8				not described	
37	66	SCC	liver					alive at the 3rd month	chemoradiation therapy
38	68	SCC	bone, LN, lung	low level				alive at the 9th month	chemotherapy
39	62	SCC	none	2.76				alive at the 36th month	chemotherapy
40	68	SCC	bone, LN	61.61				17	chemotherapy
41	58	SCC	LN	2.54				alive at the 6th month	chemotherapy
42	84	SCC	bone, seminal gland	0.018				alive at the 3rd month	chemotherapy
43	78	SCC	bone, LN, seminal gland	1.45				25	chemotherapy
44	69	SCC	LN	1.72				7	chemotherapy
45	23	SCC	bone	1.38				5	chemotherapy
46	54	SCC	bone, lung, mediastinum	2.21				1	chemotherapy
47	65	SCC	LN	7.44→0.10 (2)				alive at the 17th month	surgical castration
48	76	SCC	none	11.4→0.058 (1)				alive at the 6th month	surgical castration
49	58	SCC	bone, lung, liver	16.384				1	endocrine therapy
50	69	SCC	bone, LN	0.91				not described	
51	61	SCC	bone, lung, liver	0.5			Class IV	1	
52	79	SCC	brain	13			class unknown	not described	
53	68	SCC		5				not described	
54	72	SCC	none	1.26				alive at the 18th month	
55	69	SCC	none	1.72				8	
56	70	SCC	bone, LN, lung, liver	1.39				1	

Interval : Interval from the diagnosis of adenocarcinoma to the diagnosis of small cell carcinoma

adeno : adenocarcinoma ; SCC : small cell carcinoma ; NEC : neuroendocrine carcinoma ; LN : lymph-node

かった。さらに、生検組織の免疫組織学的検索においても前立腺マーカー陽性像を証明しえず、病理学的に原発臓器を特定することは困難であった。しかし、画像診断では経過中一貫して腫瘍の主座は前立腺に存在していたこと、既報告においても本例と同様に前立腺癌の経過中に小細胞癌を発症する症例が少なからず存在することから、総合的に勘案して前立腺原発と推定した。

前立腺癌は近年増加傾向にあり、病期の進んだ症例に対して内分泌療法が施行されることが多い。内分泌療法症例、特にホルモン抵抗性腺癌症例の経過観察中に尿細胞診で本報告のような N/C 比の高い異型細胞を認めた場合には、小細胞癌への形質転換も念頭におき臨床医と情報交換する必要がある。

開示すべき利益相反状態はありません。

### Abstract

**Background** : Small cell carcinoma (SCC) of the prostate is a rarely encountered entity, and it is even rarer for tumor cells to appear in the urine. We report the case of a patient in whom SCC of the prostate was detected based on the findings of urinary cytology during endocrine therapy for adenocarcinoma of the prostate.

**Case** : A male in his sixties was diagnosed as having prostatic adenocarcinoma based on a high serum level of prostate-specific antigen (PSA) and imaging findings. Thirteen months after the initiation of endocrine therapy, the serum PSA decreased to within the normal range, and both the primary and metastatic foci decreased in size. However, 24 months later, SCC was suspected based on the findings of urinary cytology and confirmed by biopsy of the prostate. Urinary cytology showed isolated or small aggregates of small atypical cells with a high N/C ratio in a clean background. The tumor cells contained hyperchromatic nuclei, inconspicuous nucleoli and scant cytoplasm, with nuclear molding and formation of rosette-like structures.

**Conclusion** : When urinary cytology shows atypical cells with a high N/C ratio during or after endocrine therapy for prostate adenocarci-

noma, it is important to consider the possibility of SCC transformation of the adenocarcinoma.

### 文 献

- 1) Helpap, B., Köllermann, J. Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features : immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis. *Virchows Arch* 1999 ; 434 : 385-391.
- 2) Abbas, F., Civantos, F., Benedetto, P., Soloway, M. S. Small cell carcinoma of the bladder and prostate. *Urology* 1995 ; 46 : 617-630.
- 3) 藤原 恵, 梶原忠雄, 和田健一, 宮崎徳義. 尿中の前立腺癌細胞の検討. *日臨細胞広島会報* 2006 ; 27 : 21-25.
- 4) Wenk, R. E., Bhagavan, B. S., Levy, R., Miller, D., Weisburger, W. Ectopic ACTH, prostatic oat cell carcinoma, and marked hypernatremia. *Cancer* 1977 ; 40 : 773-778.
- 5) Ramalingam, S., Eisenberg, A., Foo, W. C., Freedman, J., Armstrong, A. J., Moss, L. G., et al. Treatment-related neuroendocrine prostate cancer resulting in Cushing's syndrome. *Int J Urol* 2016 ; 23 : 1038-1041.
- 6) Wang, W., Epstein, J. I. Small cell carcinoma of the prostate—A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases. *Am J Surg Pathol* 2008 ; 32 : 65-71.
- 7) Tanaka, M., Suzuki, Y., Takaoka, K., Suzuki, N., Murakami, S., Matsuzaki, O., et al. Progression of prostate cancer to neuroendocrine cell tumor. *Int J Urol* 2001 ; 8 : 431-436.
- 8) 松岡庸洋, 種田建史, 上坂裕香, 関井謙一郎. シスプラチン抵抗性を示した前立腺小細胞癌の 1 例. *泌尿器外科* 2017 ; 30 : 101-104.
- 9) 覚野綾子, 小笠原利忠, 西上隆之, 澁谷昌広, 松林謙治. 尿中に腫瘍細胞が出現した前立腺原発神経内分泌腫瘍の 1 例. *明和医学誌* 2015 ; 2 : 54-57.
- 10) 日本肺癌学会, 編. *臨床・病理 肺癌取扱い規約* 第 8 版. 東京 : 金原出版 ; 2017.
- 11) Toll, A. D., Ali, S. Z. Urinary cytology and clinical correlates of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Acta Cytol* 2013 ; 57 : 495-500.

## 症 例

# 髄液中にメラニン色素を含有する異型細胞を認めた小児の髄膜黒色腫症の1例

南部 順一<sup>1)</sup> 仲里 巖<sup>1)</sup> 比嘉 良弘<sup>2)</sup>

沖縄県立南部医療センター・こども医療センター病理診断科<sup>1)</sup>, 同 臨床検査部<sup>2)</sup>

**背景**：小児の髄膜黒色腫症はきわめてまれな疾患である。今回われわれは髄液中にメラニン色素を含有する異型細胞を認めた髄膜黒色腫症の小児の1例を経験したので報告する。

**症例**：4歳，男児。起立困難，嘔吐，意識変容を主訴に脳炎疑いで入院。入院後，MRI読影にて脳軟膜メラノーシスを疑う所見との指摘あり，髄液細胞診および脳生検が施行された。髄液中にはメラニン色素を含有する異型細胞の出現がみられた。脳生検ではクモ膜下にメラニン色素を含有する異型細胞が増殖し，脳実質への浸潤がみられ，髄膜黒色腫症の診断にいたった。

**結論**：髄膜黒色腫症はきわめてまれな疾患で，症状や画像所見は非特異的で髄膜炎などとの鑑別が困難なことがあり，髄液細胞診が診断において重要な役割を担っている。

**Key words** : Meningeal melanomatosis, Cytology, Cerebrospinal fluid, Pediatric, Case report

## I. はじめに

髄膜黒色腫症はきわめてまれな疾患で，その発症率はわかっていないが，神経皮膚メラノーシスとの関連性が強いことが知られている。今回われわれは髄液細胞診および脳生検によって髄膜黒色腫症の診断にいたった1例を経験したので，若干の文献的考察を加えて報告する。

Pediatric meningeal melanomatosis with the presence of atypical melanocytic cells in the cerebrospinal fluid — A case report —

Junichi NAMBU<sup>1)</sup>, M. D., Iwao NAKAZATO<sup>1)</sup>, M. D., Yoshihiro HIGA<sup>2)</sup>, C. T., J. S. C.

<sup>1)</sup>Department of Diagnostic Pathology, <sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, Okinawa Prefectural Nanbu Medical Center & Children's Medical Center

論文別刷請求先 〒901-1193 沖縄県島尻郡南風原町字新川118の1 沖縄県立南部医療センター・こども医療センター病理診断科 南部順一

令和3年4月15日受付

令和3年5月7日受理

## II. 症 例

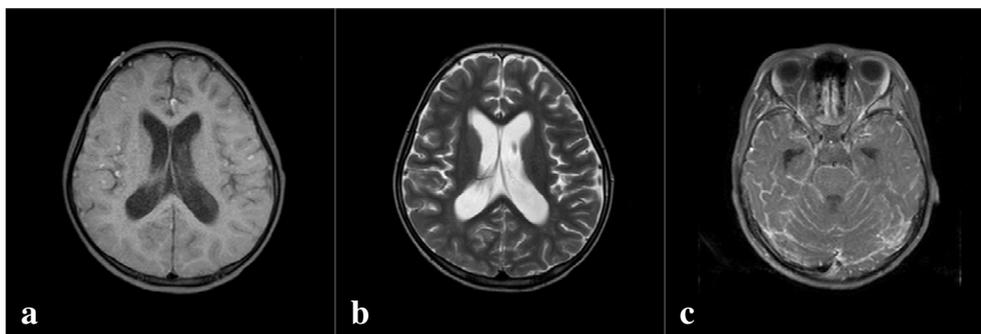
**患 者**：4歳，男児。

**主 訴**：起立困難，嘔吐，意識変容。

**既往歴**：特記事項なし。

**成長・発達**：健診にて異常指摘なし。

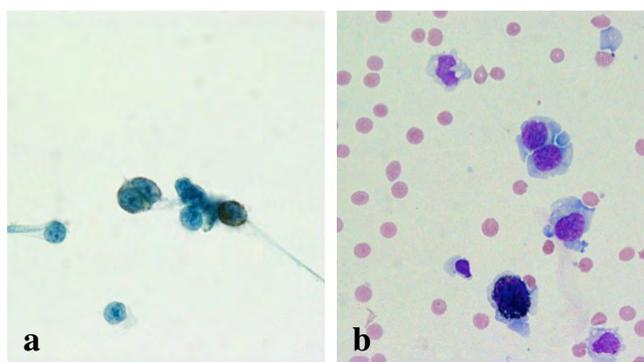
**現病歴**：入院の2ヵ月前より食後の嘔吐を繰り返し，入院当日に起立困難，嘔吐，意識変容を主訴に前医に搬送。精査のために施行された頭部CT/MRIにて脳炎が疑われ，全身管理の必要性和精査加療のため当院緊急搬送となった。入院後，脳炎疑いとして精査を進めるも診断に難渋し，入院12日目に痙攣発作の反復，意識レベル低下を認め，pediatric intensive care unit (PICU)に入室し挿管管理となった。この時，初診時の頭部MRIの再検討を当院放射線科医師に依頼するとともに，当院で造影MRI検査を施行した。その結果，T1強調画像で高信号病変が脳表に多数みられ (Fig. 1a)，これらはT2強調画像で等信号を示し (Fig. 1b)，造影後T1強調画像では両側大脳半球・小脳脳幹部表面に造影効果をびまん性に認めた (Fig. 1c)。これらの所見から軟膜メラノーシスを疑うとの意見を得た。また同時に



**Fig. 1** T1-weighted MR image showing spotty hyperintense lesions on the brain surface (a). The lesions are isointense on T2-weighted MR images (b). Dilatation of the lateral ventricle is also seen. Gadolinium-enhanced T1-weighted MR image showing diffuse leptomeningeal enhancement (c).



**Fig. 2** The brain surface is covered by black-colored lesions.



**Fig. 3** Cerebrospinal fluid cytology shows atypical cells with enlarged nuclei, prominent nucleoli, and occasionally melanin pigment (a: Pap. staining,  $\times 40$ ; b: Giemsa staining,  $\times 40$ ).

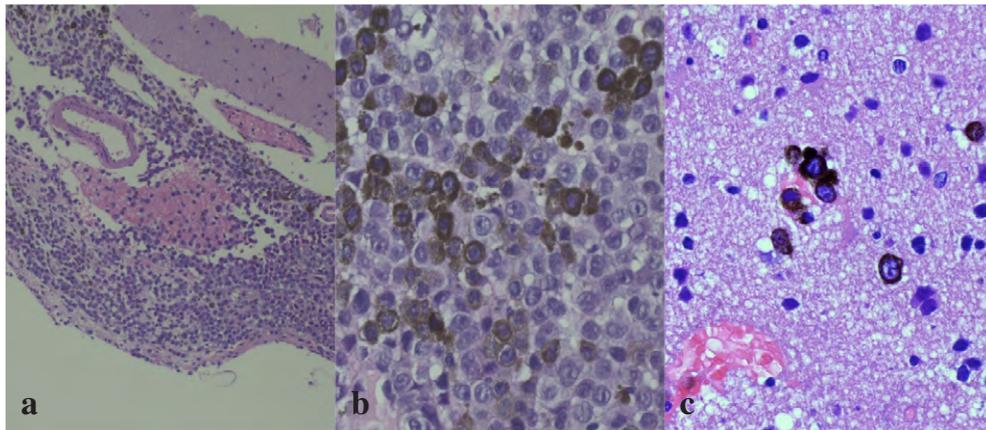
脳室の拡大も指摘された。容態悪化は水頭症によるものと考え、同日腰椎穿刺を行い、同時に髄液細胞診を提出した。入院 13 日目には Cushing 兆候が出現したため、緊急でオンマイヤーリザーバー留置術を施行することとなり、合わせて脳生検も行われた。右前頭部を小開頭し、硬膜に十字切開を加え展開したところ、クモ膜下に斑状に広がる黒色病変が確認され (Fig. 2)、検体を採取して提出した。髄液細胞診および脳生検ではメラニン色素を含有する腫瘍細胞がみられた。皮膚科による体表の検索では皮膚原発の悪性黒色腫や神経皮膚メラノシスを示唆するような巨大色素性母斑は認めなかった。中枢神経以外に原発を疑うような病変はなく、中枢神経原発の髄膜黒色腫症と考えた。髄膜黒色腫症の確立された治療法はなく、ご家族と相談のうえ、ご家族の強い希望もあり悪性黒色腫の治療に準じて、免疫チェックポイント阻害薬による免疫療法を開始した。治療開始後も病勢は穏やかに進行していき、容体が急変する前に自宅で家族と過ごせるよう、入院後 105 日目に他院転院となった。転院から約 1 ヶ月後、病変の増悪で死亡となるも病理解剖は行われなかった。

### III. 細胞学的所見

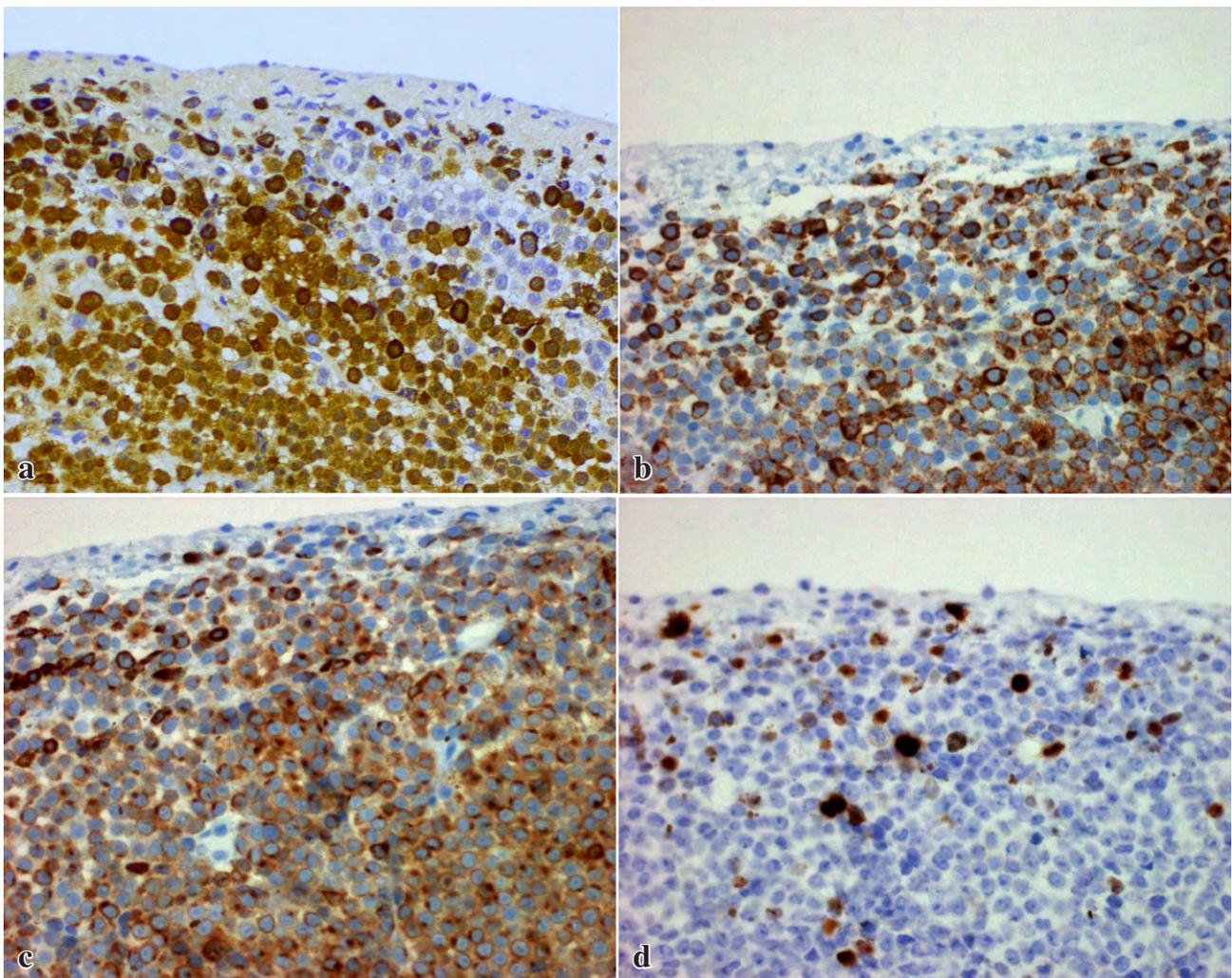
Papanicolaou 染色では核腫大や核形不整、時に明瞭な核小体を有する N/C 比の高い異型細胞が孤在性にみられた。一部はメラニン色素を含有していた。Giemsa 染色でも好塩基性細胞質を有する異型細胞がみられ、一部はメラニン色素を含有していた (Fig. 3)。

### IV. 病理学的所見

生検ではクモ膜下にびまん性に類円形核、明瞭な核小体を有し、一部にメラニン色素を含有する異型細胞が増殖していた (Fig. 4a, b)。脳実質内にも同様の腫瘍細胞が孤在性にみられた (Fig. 4c)。核内細胞質封入体 (Apitz 小体) もみられた。核分裂像は少数。免疫染色では S-100, human melanin black-45 (HMB-45), MelanA が陽性 (Fig. 5a-c)。Ki-67 陽性細胞は 10% 程度 (Fig. 5d)。



**Fig. 4** Histological findings of brain biopsy. Tumor cells proliferating under the arachnoid (a : HE staining,  $\times 10$ ). These cells contain oval nuclei, prominent nucleoli, and occasionally, melanin pigment (b : HE staining,  $\times 40$ ). Invasion of the cerebral parenchyma is seen (c : HE staining,  $\times 40$ ).



**Fig. 5** Immunohistochemical findings of brain biopsy. Immunopositivity for S-100 (a,  $\times 20$ ), HMB-45 (b,  $\times 20$ ), and MelanA (c,  $\times 20$ ). The Ki-67 labeling index was about 10% (d,  $\times 20$ ).

## V. 考 察

中枢神経原発の黒色腫はまれな疾患で、脳原発の全腫瘍のうち 0.05% 程度を占めるとされている。髄膜での黒色腫細胞のびまん性増殖である髄膜黒色腫症は、特に小児においては、さらにきわめてまれな疾患である<sup>1)</sup>。

本例は当初脳炎を疑われていたが、画像所見で軟膜メラノシスを疑われ、髄液細胞診および生検にて髄膜黒色腫症の診断にいたった症例である。髄膜黒色腫症の症状は非特異的で、頭痛や嘔気・嘔吐、頸部・背部痛のほか、感覚障害をはじめとする神経症状が報告されている<sup>2)</sup>。

画像所見も髄膜黒色腫症は特徴的な変化を示さないが、MRI が診断の一助になるとされている。メラニン色素は磁性体としての性質を有しているため、病変部が T1 強調画像で高信号を呈し、T2 強調画像で低信号から等信号を呈し、ガドリニウム造影 MRI で強調される<sup>1,3)</sup>。本例も MRI 所見で軟膜メラノシスを疑われたことが診断の契機となった。

髄液細胞診は髄膜黒色腫症の確定診断に必須の検査であり、本例では初回の髄液細胞診でメラニン色素を有する腫瘍細胞が確認されたが、髄液細胞診の感度は低く、細胞診で陰性となることもまれではない<sup>2-4)</sup>。当初髄膜炎と診断され、複数回の髄液細胞診でも診断にいたらず開頭脳生検された例も報告されている<sup>5)</sup>。またメラニン色素含有量の少ない非色素性悪性黒色腫症では、MRI で所見が得にくく、髄液細胞診でも異型細胞にメラニン色素が乏しい場合があり、HMB-45 と S-100 による免疫染色の有用性が報告されている<sup>6,7)</sup>。

中枢神経原発のメラニン細胞性腫瘍は、小児においては神経皮膚メラノシスとの関連性が強いことが知られている。皮膚神経メラノシスは巨大あるいは多数の先天性色素細胞性母斑と、良性あるいは悪性の中枢神経のメラニン細胞性腫瘍を合併するまれな疾患である。巨大先天性色素細胞性母斑が 50 万人から 2 万人に 1 人とされ、そのうちの 2.5% から 45% に神経皮膚メラノシスがみられるとされている<sup>8)</sup>。また髄膜黒色腫の患者の 25% に巨大先天性色素細胞性母斑を有していたとされている<sup>3)</sup>。本例では体表の検索で皮膚原発の悪性黒色腫や神経皮膚メラノシスを示唆するような巨大色素性母斑は認めなかった。胸腹部の単純および造影 CT 検査も行われたが、中枢神経以外に原発を疑うような病変はなく、中枢神経原発の髄膜黒色腫症と考えた。

本例は髄液中にメラニン色素を含有する異型細胞を認めた髄膜黒色腫症の 1 例であった。髄膜黒色腫症はきわめてまれな疾患で、症状や画像所見は非特異的で髄膜炎などと

の鑑別が困難なことがあり、髄液細胞診が診断において重要な役割を担っている。髄膜細胞診の感度は低いため、繰り返しの検査や有用な免疫染色を利用することが早期の診断につながると考える。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

## Abstract

**Background :** Meningeal melanomatosis is an extremely rarely encountered condition in pediatric practice. Herein, we report a case of pediatric meningeal melanomatosis in which atypical melanocytic cells were detected in the cerebrospinal fluid.

**Case :** A 4-year-old boy was admitted to our hospital with a history of dysstasia, vomiting and altered consciousness, and was suspected as having encephalitis. After admission, the findings of MRI suggested the possibility of leptomeningeal melanosis, and cerebrospinal fluid (CSF) cytology and brain biopsy were performed. CSF cytology showed atypical cells with intracytoplasmic melanin, and brain biopsy revealed atypical cells containing melanin proliferating under the arachnoid membrane and invading the cerebral parenchyma. Finally, the diagnosis of meningeal melanomatosis was established.

**Conclusion :** Meningeal melanomatosis is extremely rare. Neither the symptoms nor the imaging findings are specific, and it is often difficult to distinguish this condition from other diseases of the nervous system, like meningitis. CSF cytology has an important role in the diagnosis.

## 文 献

- 1) Xu, X., Zheng, Y., Li, J., et al. Pediatric primary diffuse leptomeningeal melanomatosis : Case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2020 ; 99 : e19178.
- 2) 服部香寿美, 松田 希, 村上丈伸・ほか. 急性の経過で対麻痺, 多発脳神経麻痺を来した髄膜悪性黒色腫症の 1 例. *臨牀神経* 2017 ; 57 : 769-774.
- 3) Szathmari, A., Perbet, R., Hermier, M., et al. Primary Amelanotic Leptomeningeal Melanomatosis in a Child : A Rare but Severe Disease. *World Neurosurg* 2016 ; 92 : 581.e15-581.e20.
- 4) Eichberg, D. G., Achua, J. K., Locatelli, E., et al. Primary Diffuse Leptomeningeal Melanomatosis : Case Report and Review of the Literature. *World Neurosurg* 2019 ; 122 : 648-655.
- 5) Hsieh, Y. Y., Yang, S. T., Li, W. H., et al. Primary leptomeningeal melanoma mimicking meningitis : a case report and literature review. *J Clin Oncol* 2015 ; 33 : e57-e61.
- 6) Tosaka, M., Tamura, M., Oriuchi, N., et al. Cerebrospinal fluid immunocytochemical analysis and neuroimaging in the diagnosis of primary leptomeningeal melanoma : Case report. *J*

- Neurosurg 2001 ; 94 : 528-532.
- 7) 田村悠紀子, 梅田能生, 梅田麻衣子・ほか. 髄液の免疫染色で診断しえた髄膜黒色腫症の1例. 臨神経 2020 ; 60 : 565-568.
- 8) Alikhan, A., Ibrahimi, O. A., Eisen, D. B. Congenital melanocytic nevi : where are we now? Part I . Clinical presentation, epidemiology, pathogenesis, histology, malignant transformation, and neurocutaneous melanosis. J Am Acad Dermatol 2012 ; 67 : 495.e1-17.
-

## 症 例

細胞転写法を用いた免疫染色が原発巣の推定に有用であった  
頸部リンパ節転移癌の1例

渡邊 弥生<sup>1)</sup> 小池 清登<sup>1)</sup> 齋藤 知央<sup>1)</sup> 西尾 淳<sup>1)</sup>  
加藤 浩<sup>1)</sup> 伊藤 修<sup>1)</sup> 立山 尚<sup>2)</sup>  
春日井市民病院臨床検査技術室<sup>1)</sup>, 同 病理診断科<sup>2)</sup>

背景：限られた細胞診材料でも細胞転写法により，複数の抗体の免疫染色が可能となる．今回，リンパ節の穿刺吸引細胞診標本から細胞転写法を用いて免疫染色を行い，原発巣の推定が可能であった症例を経験した．

症例：80歳代，女性．2年前に肺腺癌と診断された．他院にて放射線治療中，左頸部の腫脹を認めた．PET-CTとエコーにて左頸部リンパ節と甲状腺左葉に腫瘍性病変が認められ穿刺吸引細胞診が施行された．甲状腺では，一部に核内封入体様の構造がみられたため，異型濾胞上皮と診断した．リンパ節では，腫大した核と明瞭な核小体をもつ細胞の集塊と，一部に核内細胞質封入体も認めた．甲状腺乳頭癌の転移を考えたが，同様の所見を示す肺腺癌の既往があり，治療方針の決定のため細胞転写法を用いた免疫染色を施行した．TTF-1, thyroglobulin, PAX8が陽性となり，リンパ節の病変は甲状腺乳頭癌の転移と考えた．

結論：放射線治療を受けている肺癌症例に出現した頸部リンパ節腫脹の穿刺吸引細胞診標本の診断は，Pap標本だけでは原発巣の推定がきわめて困難で，細胞転写標本の免疫染色により原発巣の推定が可能であった1例を報告した．

**Key words** : Metastatic carcinoma, Cell transfer technique, Cytology, Intranuclear cytoplasmic inclusion, Immunocytochemistry

## I. はじめに

今回われわれは，リンパ節の穿刺吸引細胞診で転移性癌

と診断し，その細胞診標本から細胞転写法<sup>1-3)</sup>を用いて免疫染色を行い，原発巣の推定が可能であった症例を経験したので報告する．

## II. 症 例

患者：80歳代，女性．

既往歴：今回の受診の2年前に定期健康診断の胸部X線写真で右肺に異常陰影を指摘され，当院呼吸器内科を受診された．経気管支肺生検で腫大した核と弱好酸性の胞体をもつ細胞が重層性を増しながら一部腺管状に増殖し，核内細胞質封入体と思われる所見を少数に認めた (Fig. 1A)．その捺印細胞診では，核の腫大とクロマチンの増加を示す細胞の重積性の集塊がみられ，肺腺癌と診断された (Fig. 1B)．

A case of cervical lymph node metastasis in which the primary lesion was identified by immunostaining using the cell transfer technique

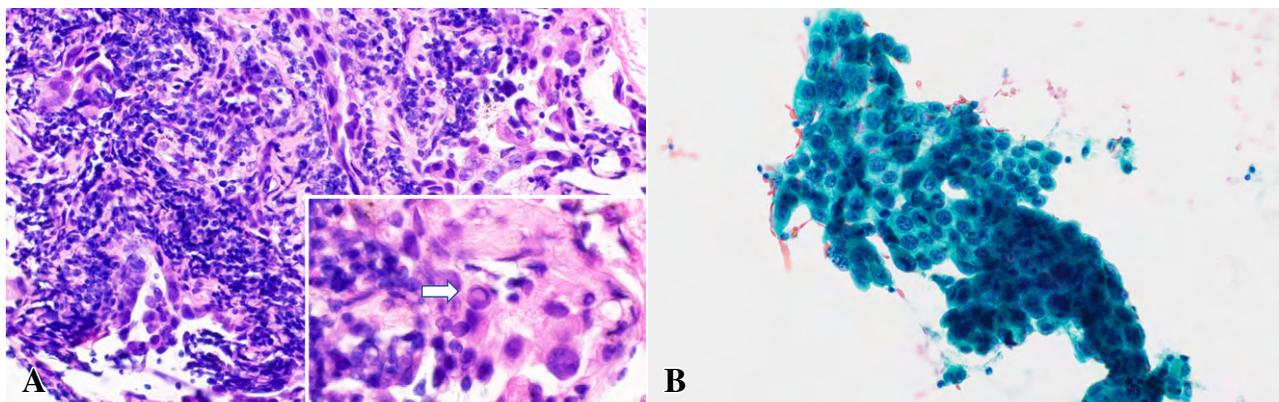
Yayoi WATANABE<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Kiyoto KOIKE<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Tomohiro SAITO<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Jun NISHIO<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Hiroshi KATO<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Osamu ITO<sup>1)</sup>, C. T., J. S. C., Hisashi TATEYAMA<sup>2)</sup>, M. D.

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, <sup>2)</sup>Department of Pathology, Kasugai Municipal Hospital

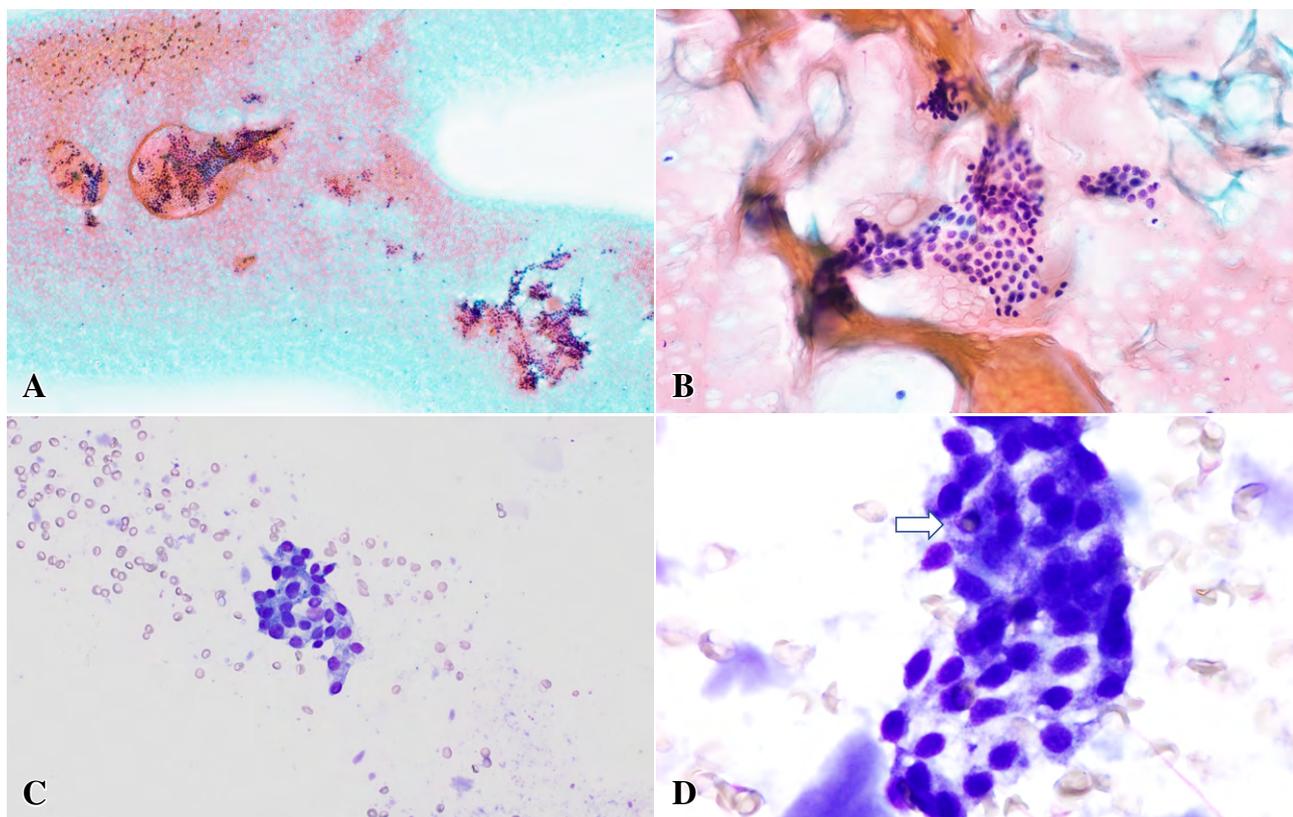
論文印刷請求先 〒486-8510 愛知県春日井市鷹来町1の1の1 春日井市民病院臨床検査技術室 渡邊弥生

令和3年4月27日受付

令和3年6月28日受理



**Fig. 1** Histology of TBLB specimens showing atypical glandular cells with enlarged nuclei and eosinophilic cytoplasm. Some atypical cells contain intranuclear cytoplasmic inclusions (arrow) (A) (H. E. staining,  $\times 40$ ; inset:  $\times 100$ ). Cytology of touch smears of TBLB specimens showing cohesive aggregates of atypical cells exhibiting nuclear enlargement and formation of acinar structures (B) (Pap. staining,  $\times 40$ ).



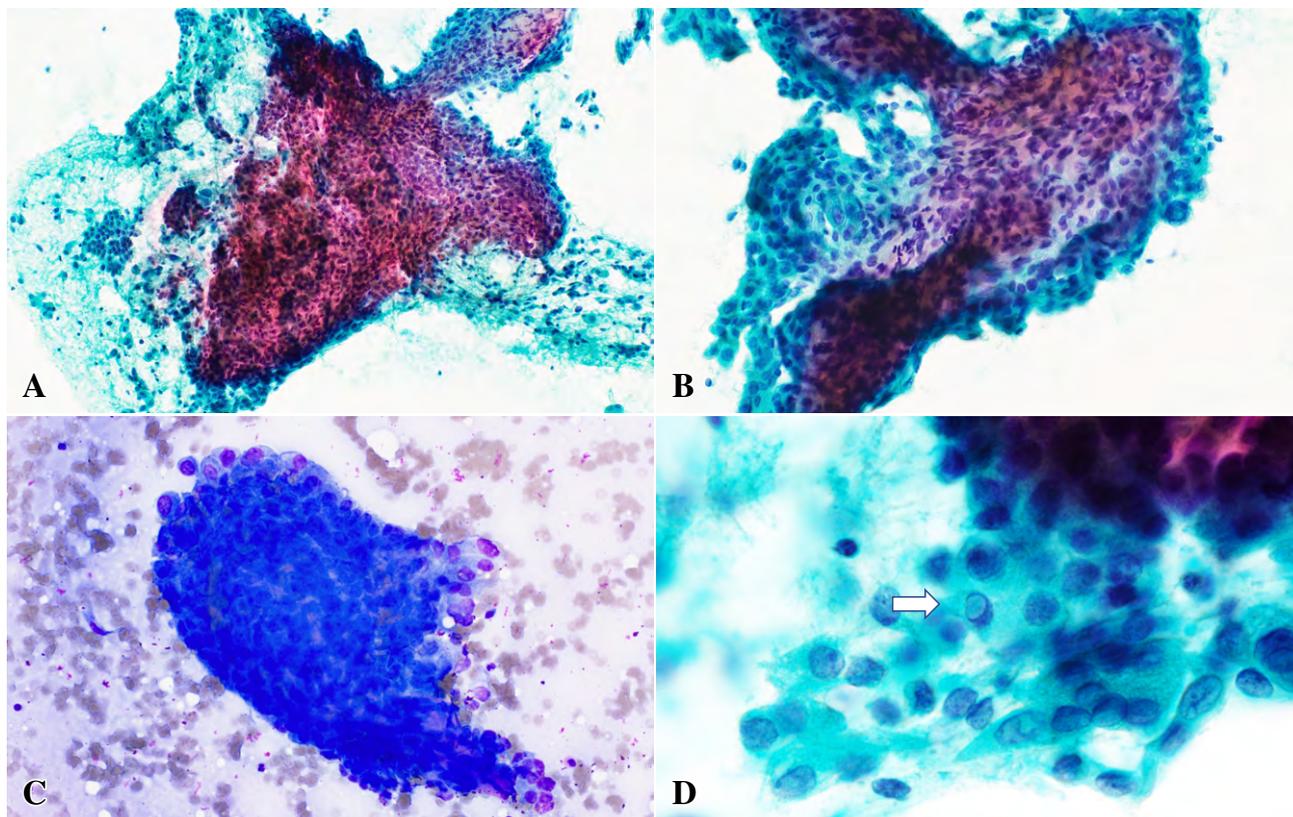
**Fig. 2** Cytology of thyroid tissue specimens showing sheet-like clusters of follicular epithelial cells in a background of colloid (A-C). A few of the cells showed intranuclear inclusion-like structures (arrow) (D) (A, B: Pap. staining,  $\times 40$ ; C: Giemsa staining,  $\times 40$ ; D: Giemsa staining,  $\times 100$ ).

現病歴：他院にて肺癌に対し放射線治療を行い腫瘍は縮小した。その後の経過観察中、CTで左頸部リンパ節の腫大を認めた。またPET-CTでは甲状腺左葉にも強い集積亢進がみられ、肺癌が指摘されて2年後、精査目的で当院の耳鼻咽喉科を紹介受診された。来院時のエコー検査で、甲状腺左葉、左頸部リンパ節ともに腫瘤性病変が認めら

れ、この2つの病変に対して穿刺吸引細胞診が施行された。

### III. 細胞学的所見

甲状腺左葉：コロイドを背景にシート状の濾胞上皮細胞の小集塊を認めた。一部に核内封入体様の構造がみられた



**Fig. 3** Cytology of lymph node specimens showing clusters of atypical cells with enlarged nuclei and small nucleoli (A-C). Intranuclear cytoplasmic inclusions are observed (arrow) (D) (A : Pap. staining,  $\times 20$  ; B : Pap. staining,  $\times 40$  ; C : Giemsa staining,  $\times 40$  ; D : Pap. staining,  $\times 100$ ).

が少数であったため、異型濾胞上皮細胞（鑑別困難）と診断した（Fig. 2）。

左頸部リンパ節：核形不整な腫大した核をもつ細胞の重積性を示す集塊を認めた。核内細胞質封入体も観察され甲状腺乳頭癌の転移を第一に考えたが、甲状腺標本における異型細胞が少数であり、また同じような細胞所見を示す肺腺癌の既往があったため、確定診断は困難であると考え転移性癌と診断した（Fig. 3）。

臨床医より患者がこれ以上の検査を拒否しているが、リンパ節転移性腫瘍が肺由来か甲状腺由来かで治療方針が変わるため、何とか原発巣を特定してほしいとの依頼があった。リンパ節穿刺吸引細胞診の標本から細胞転写法を用いて複数の標本作製し、肺腺癌と甲状腺乳頭癌の鑑別に有用と考えられる抗体を組み合わせ、免疫染色を行うこととした。

#### IV. 細胞転写法と免疫組織化学染色

細胞転写法は細胞検査士会から発行されている細胞診標本作製マニュアル（体腔液）<sup>4)</sup>に準じて行った。まず、標本を顕微鏡で観察し、目的の細胞にマークを付け、標本のス

ライドガラスの裏側の同じ位置にマークを付ける。その後、キシレンに浸してカバーガラスを除去する。カバーガラスを外した標本に封入剤としてマリノール（武藤化学株式会社）を薄く塗布し、60℃のオープンの中で封入剤を乾かす。硬化した封入剤の上から、目的の細胞にマークを付ける。マークを付けた標本を60℃の温水中に浸し、封入剤を軟らかくする。軟らかくなった封入剤にナイフを端から入れてスライドガラスから剥がす。このとき、塗抹されていた細胞は封入剤の裏側に付着している。剥がし取った細胞を分割し、別のスライドガラス（剥離防止コートスライドガラス）に載せ貼り付ける。60℃のオープンの中で十分に乾燥させ、転写が完了となる。

免疫染色は自動免疫染色装置（BENCHMARK XT, Ventana）を用いて行った。細胞転写が完了したスライドガラスをキシレンに入れ封入剤を完全に溶かし、アルコールを通して水洗する。その後は通常の免疫染色と同様の工程となる。Papanicolaou 染色標本から細胞転写を行っているが、加熱や水洗でかなり脱色され、脱色操作は特に行っていない。一次抗体は抗 TTF-1 抗体（DAKO, USA）、抗 thyroglobulin 抗体（DAKO）、抗 PAX8 抗体（Roche, Germany）、抗 napsin A 抗体（ニチレイ、日本）を使用し、

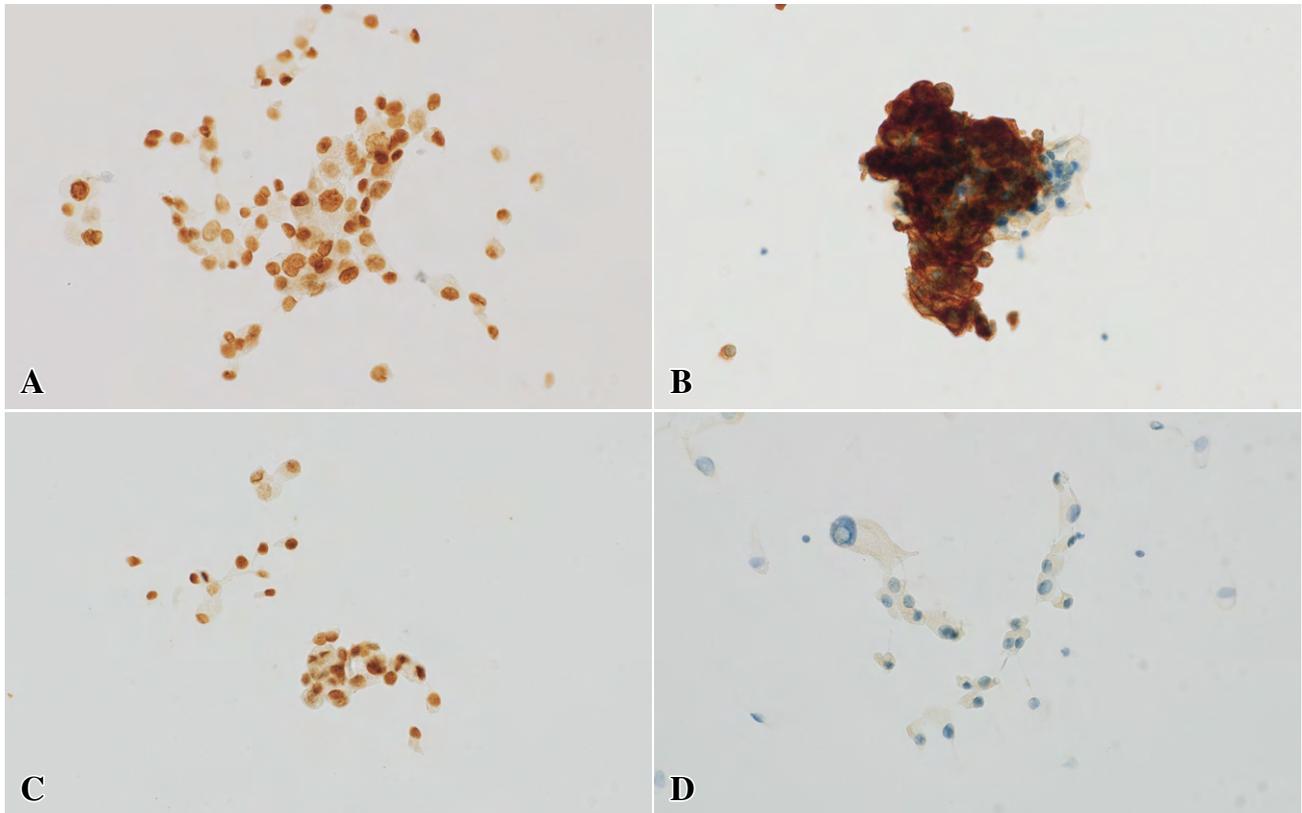


Fig. 4 Immunocytochemistry of cell-transfer materials showing positive staining for TTF-1 (A), thyroglobulin (B), and PAX8 (C), and negative staining for napsin A (D) (A-D :  $\times 40$ ).

TTF-1, PAX8については抗原賦活化のため熱処理を行った。

## V. 免疫組織化学的所見

免疫染色にて TTF-1, thyroglobulin, PAX8 が陽性, napsin A が陰性となり (Fig. 4), リンパ節の病変は甲状腺乳頭癌の転移と考え, 臨床医に報告を行った。

## VI. 考 察

細胞転写法は1983年にBrown<sup>5)</sup>が報告した壊れた組織標本を封入剤である合成樹脂を用いて修復した手法に基づいている。彼は壊れた標本のカバーガラスを外して封入剤を組織片上に直接塗布して硬化させ, 再び軟化させた後, 組織片とともに封入剤を剥離し, 別のスライドガラスに貼り付けることにより組織標本を修復した。その後, 各種封入剤を用いた細胞転写法の検討により, 免疫染色や特殊染色, 電子顕微鏡的検索にも使用できることが報告され<sup>2,6)</sup>, 現在では *in situ hybridization* にも応用されている<sup>7)</sup>。われわれの施設では細胞転写標本作製マニュアル (体腔液)<sup>4)</sup>の手順を参考にし, 作業時間短縮のため, 封入剤の硬化と軟化,

乾燥の過程において, 通常より少し高めの温度設定 (60°C)で行っているが, 免疫染色でも良好な結果を得ている。また, 60°Cの孵卵器は病理組織の特殊染色でも加温に用いており, 通常の業務内で行いやすい。

本例では甲状腺およびリンパ節から採取された細胞に核内細胞質封入体を認めた。核内封入体とは核の中に形成される核とは異なった染色態度を示す形態学的な変化である。本来核内に存在しない異質な物質の核内蓄積により形成される真の核内封入体と, 核膜の高度の変形による細胞質の核内彎入のために形成される偽の核内封入体 (核内細胞質封入体) がある<sup>8)</sup>。真の封入体の代表的なものとしてウイルス感染があり, 形態学的に封入体が核内を満たす full 型と封入体の周囲に halo を伴う Cowdry A 型がある。一方, 核内細胞質封入体は細胞質そのものであり, 電顕では封入体の中にミトコンドリアや小胞体など細胞質の小器官が観察される<sup>9)</sup>。病理診断を行ううえで真の核内封入体と核内細胞質封入体を鑑別することは非常に重要であるが, 後者は核膜で囲まれて核質と封入体の間は明瞭であり, 封入体の外縁にしばしばクロマチンの凝集が観察されるため, 鑑別は可能である<sup>10)</sup>。核内細胞質封入体は甲状腺乳頭癌の特徴的な細胞所見の一つであるが, 肺腺癌, 乳癌,

肝細胞癌, 悪性黒色腫などの悪性腫瘍や皮膚の母斑細胞母斑, 髄膜種, 乳腺硬化性乳頭腫などの良性腫瘍でも観察される。核内細胞質封入体そのものは, いずれの腫瘍においても光顕的に同様の形態を示し, この所見のみで腫瘍の鑑別をすることはできない。今回の症例は肺腺癌の既往があり, 放射線治療後の経過観察中に頸部リンパ節腫大が出現し, PET-CT や超音波検査により甲状腺に結節が発見されたものである。甲状腺と頸部リンパ節の穿刺吸引細胞診とともに核内細胞質封入体が認められ, 甲状腺乳頭癌の転移を第一に考えたが, 甲状腺細胞診標本における異型細胞の数が少なく, 鑑別困難(現行の甲状腺癌取扱い規約の判定区分では意義不明)とせざるをえなかった。また同じような細胞所見を示す肺腺癌の既往があり, 原発巣を確定できなかった。細胞診の再検査ができない状況であり, 確定診断のために細胞転写法を用いた免疫染色を施行した。

免疫染色は細胞転写法により作製された標本に限りがあったため, 一次抗体として TTF-1, thyroglobulin, PAX8, napsin A に対する抗体を選択した。TTF-1 は正常の甲状腺, 肺, 脳で認められる転写因子で, 肺腺癌と甲状腺乳頭癌ともに陽性となる<sup>11)</sup>。Thyroglobulin は甲状腺の濾胞上皮細胞で産生され, 未分化癌以外の甲状腺濾胞上皮性腫瘍に特異度が高く, 他の臓器由来の腫瘍には発現しない<sup>12)</sup>。細胞所見に類似性のみられる肺腺癌と甲状腺癌の鑑別において TTF-1 と thyroglobulin の免疫染色の有用性が報告されている<sup>13)</sup>。PAX8 は甲状腺, ミューラー管, 腎臓の分化・発育に重要な役割を果たす転写因子で, これらの臓器由来の腫瘍にも発現する。甲状腺乳頭癌に陽性となり, 肺腺癌では陰性である<sup>14)</sup>。Napsin A は II 型肺胞上皮と腎尿細管で発現するタンパク分解酵素で, 肺腺癌と腎細胞癌で陽性となる。甲状腺濾胞癌では陰性であるが, 乳頭癌では 5% 程度に陽性となることがある<sup>15)</sup>。本例では TTF-1, thyroglobulin, PAX8 が陽性となり, 甲状腺乳頭癌の頸部リンパ節転移が考えられると最終報告を行った。現在, 患者は本人の希望により甲状腺腫瘍の治療は行わず経過観察中で, リンパ節は増大傾向を認めている。また, 右肺腫瘍には変化は認めないものの, 左肺に多房性病変が出現し, 転移の可能性も指摘されている。

## VII. 結 語

放射線治療後の肺癌症例に出現した頸部リンパ節腫脹では, 穿刺吸引細胞診標本のみでは診断が難しく, 細胞転写法を用いた免疫染色により原発巣の推定が可能となった 1 例を報告した。細胞転写法は, 特に今回の症例のような, 再検査が不可能な場合には有用といえる。また, 本例のよ

うに腫瘍に特異的なマーカーが存在する場合には, 組織型の鑑別診断や治療方針の決定にも有用であった。

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 59 回日本臨床細胞学会総会春期大会(2018 年 6 月)にて発表した。

## Abstract

**Background :** The cell transfer technique is a useful method for performing immunostaining when the amount of cytology material is limited. We report a case with a metastatic tumor in which the primary lesion could be identified by immunostainings performed using the cell transfer technique.

**Case :** The patient, a woman in her 80 s, had been diagnosed as having lung adenocarcinoma two years prior to the present consultation. During the course of radiation therapy, a swelling was detected in her left neck. PET-CT scan and ultrasonography revealed a mass lesion in both the left cervical lymph node and the left thyroid. The cytological findings of the thyroid lesion were interpreted as atypical follicular epithelial cells of undetermined significance, because of intranuclear inclusion-like structures. Cytological examination of the lymph node specimens showed some atypical cells with intranuclear cytoplasmic inclusions. Metastatic thyroid papillary carcinoma was suspected, however, the patient had a past history of lung adenocarcinoma, cytologic features of which could overlap those of papillary carcinoma. To identify the primary site, immunostainings were performed using the cell transfer technique. The tumor cells were positive for TTF-1, thyroglobulin, and PAX8, suggesting metastasis from papillary thyroid carcinoma.

**Conclusion :** We reported a case of metastatic tumor in which the primary lesion could be identified by immunostainings using the cell transfer technique, but failed to be diagnosed by Papanicolaou staining alone.

## 文 献

- 1) Brown, G. G., Tao, L. C. Restoration of broken cytology slides and creation of multiple slides from a single smear preparation. *Acta Cytol* 1992 ; 36 : 259-263.
- 2) 広川満良, 有安早苗, 鐵原拓雄・ほか. マウントクイック封入剤を用いた細胞転写法の免疫細胞化学および電子顕微鏡的検索への応用. *日臨細胞会誌* 1995 ; 34 : 1236-1237.
- 3) 伊藤 仁, 宮嶋葉子, 長村義之・ほか. 迅速細胞転写法の検討. *日臨細胞会誌* 2002 ; 41 : 302-303.
- 4) 細胞検査士会, 編. 細胞診標本作製マニュアル(体腔液). 2008. 19-20.
- 5) Brown, G. G. Salvaging sections from broken slides : Some modifications to the DIATEX method and a new use to the technique sectioning aid kit. *Technique History Q* 1983 ; 2 : 1-3.

- 6) 和田江身子, 鴻池資啓, 木下康枝・ほか. 気管支アミロイドーシスの1例. 日臨細胞会誌 2000 ; 39 : 468-472.
  - 7) 大野綾子, 喜納勝成, 岡崎哲也・ほか. マリノール封入剤を用いた細胞転写法—免疫細胞化学的検索およびISH法への応用—. 日臨細胞会誌 1996 ; 35 : 657-658.
  - 8) Ip, Y. T., Dias Filho, M. A., Chan, J. K. C. Nuclear inclusions and pseudoinclusions : friends or foes of the surgical pathologist? *Int J Surg Pathol* 2010 ; 18 : 465-481.
  - 9) 矢谷隆一, 森脇賢二, 伊藤忠弘・ほか. 甲状腺乳頭状腺癌の細胞診. 耳鼻咽喉 1978 ; 50 : 151-156.
  - 10) 広川満良, 清水通生, 福屋 崇・ほか. 核内細胞質封入体様所見がみられた甲状腺腺腫様結節の1例. 日臨細胞会誌 1996 ; 35 : 49-50.
  - 11) Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2002 ; 26 : 767-773.
  - 12) Liu, H., Lin, F. Application of immunohistochemistry in thyroid pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2015 ; 139 : 67-82.
  - 13) Sathiyamoorthy, S., Meleki, Z. Cytomorphologic overlap of differentiated thyroid carcinoma and lung adenocarcinoma and diagnostic value of TTF-1 and TGB on cytologic material. *Diagn Cytopathol* 2014 ; 42 : 5-10.
  - 14) Laury, A. R., Perets, R., Piao, H., et al. A comprehensive analysis of PAX8 expression in human epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 2011 ; 35 : 816-826.
  - 15) Bishop, J. A., Sharma, R., Illei, P. B. Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2010 ; 41 : 20-25.
-

## 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。なお、編集委員会で認められた場合に限り、筆頭著者及び投稿者が会員以外であることが容認される。

## 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「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」(文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省 (令和 3 年 3 月 23 日) <https://www.mhlw.go.jp/content/000757566.pdf>) が遵守されていること。

※これらの指針は, 学会誌各年 1 号に記載。

- 4) 論文の著作権は本学会に帰属し, 著者は当学会による電子公開を承諾するものとする。セルフ・アーカイブ(自身のホームページ, 所属機関のリポジトリなど)においては表題, 所属, 著者名, 内容要旨の公開は学会誌の発行の後に認められる。
- 5) 論文投稿に際し, 著者全員の利益相反自己申告書(様式 2)を添付すること。なお, 書式は <http://www.jssc.or.jp/coi/> からダウンロードして用い, 署名欄には自署する。この様式 2 に記載した利益相反の内容は論文末尾, 文献の直前の場所に記される。規定された利益相反状態がない場合は, 同部分に, 「筆者らに, 開示すべき利益相反状態はありません。」などの文言を入れる。

## 3. 投稿形式

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

## 4. 執筆要項

- 1) 文章と文体

- (1) 用語は和文または英文とする。
- (2) 平仮名, 常用漢字, 現代仮名づかいを用いる。ただし, 固有名詞や一般に用いられている学術用語はその限りではない。
- (3) 度量衡単位は cm, mm,  $\mu\text{m}$ ,  $\text{cm}^2$ , ml, l, g, mg など CGS 単位を用いる。
- (4) 外国人名, 適当な和名のない薬品名, 器具及び機械名, または疾患名, 学術的表現, 科学用語については原語を用いる。大文字は固有名詞及びドイツ語の名詞の頭文字に限る。英文での投稿原稿の場合も和文の場合に準ずる。
- (5) 医学用語は日本臨床細胞学会編集の「細胞診用語解説集」(<http://jssc.or.jp/wp-content/uploads/2015/05/kaisetsu.pdf>) に準拠すること。また, その略語を用いても良いが, はじめに完全な用語を書き, 以下に略語を用いることを明らかにする。

## 2) 原稿の書き方

本誌電子投稿サイトの指示に従う (<https://www.editorialmanager.com/jjssc/>)。

## 3) 電子ファイル

以下の電子ファイル形式を推奨する。

表題ページ, 本文, 図, 表の説明 (Figure legend),  
参考文献: Word, RTF, TXT  
図: TIFF, JPEG, PDF  
表: Excel

なお, 図 (写真を含む) の解像度は, 雑誌掲載サイズで 300dpi 以上が目安である。

## 4) 総説・原著・調査報告・症例報告・短報論文の様式

## (1) 構成

タイトルページ, 内容要旨, 索引用語 (key words), 本文, 利益相反状態の記載 (様式 2 の内容は論文末尾に添付する), 英文要旨, 文献, 図及び表の説明, 図, 表の順とする。原稿には通し頁番号をふる。タイトルページ (1 枚目) には, 当該論文における修正稿回数 (初回, 修正 1 など), 論文の種別 (原著, 症例報告, 短報など), 和文の表題 (50 字以内), 著者名, 所属のほか論文別刷請求先, 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250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, 同居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.

#### 8) 英文校正証明書

投稿時, 著者は和文論文の英語部分, 英文論文の全文について英文校正を終了し, 校正証明書の添付を要す.

### 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)<sup>1)</sup>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) ICMJE<sup>1)</sup>が認めている、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)
2021年(令和3年)	4月17日一部改定
2022年(令和4年)	2月12日一部改定

#### 添付1 Acta Cytologica への投稿について

投稿規定は [www.karger.com/acy](http://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項目は毎年の1号に掲載する。

- ・ヘルシンキ宣言
- ・人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 URL (<https://www.mhlw.go.jp/content/000757566.pdf>)

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

## NOTICE TO CONTRIBUTORS

### 1. Authorial responsibility :

The first author and the corresponding author of this journal must be members of the Japanese Society of Clinical Cytology. In case of editorial committee's permission, they can be non-members of the society.

### 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 Biological Research Involving Human Subjects (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Ministry of Health, Labour and Welfare, Ministry of Economy, Trade and Industry, Only Japanese text available), 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,  $\mu\text{m}$ ,  $\text{cm}^2$ , 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 250 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.

#### 8) *Certification of proofreading*

At submission, the authors should have the manuscript proofread by native English speaker, and should submit certificate of proofreading as a PDF file simultaneously.

#### 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)<sup>1)</sup>", 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 ICMJE<sup>1)</sup> 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 Bio-

medical 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 17<sup>th</sup>. 2018)
- (Partial revision May 23<sup>rd</sup>. 2019)
- (Partial revision September 24<sup>th</sup>. 2019)
- (Partial revision November 21<sup>st</sup>2020)
- (Partial revision April 17<sup>th</sup>. 2021)
- (Partial revision February 12<sup>th</sup>. 2022)

## Appendix 1. Submission of manuscripts to Acta Cytologica

Please go the new Acta Cytologica website ([www.karger.com/acy](http://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 Biological Research Involving Human Subjects(Only Japanese text available)

*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 3 年~4 年)

委員長: 矢納 研二					
担当理事: 大平 達夫	三上 芳喜				
副委員長: 黒川 哲司	柳井 広之				
委員: 安倍 秀幸	伊藤以知郎	稲葉真由美	岡田 真也	河原明彦	近藤英司
品川 明子	田中良太	長尾俊孝	中里宜正	二村 梓	野村秀高
則松 良明	古田則行	星 利良	前田ゆかり	前田宜延	の田真紀
三宅 真司	棟方 哲	渡邊 純			
幹事: 石田克成	金山和樹	西川 武			
査読委員: 明石京子	明瀬光里	秋葉 純	秋元太志	安達聡介	阿部彰子
阿部英二	新井正秀	荒木邦夫	有田茂実	有安早苗	飯田哲士
五十嵐誠治	碓 益代	伊倉義弘	池田勝秀	池田 聡	池田純一郎
池田徳彦	池畑浩一	池本理恵	石井脩平	石井真美	石岡伸一
石川 亮	石田和之	板持広明	市村友季	伊東恭子	伊藤崇彦
稲垣 宏	稲山嘉明	井野元智恵	伊吹英美	今井 裕	今井律子
今野元博	今村好章	井村穰二	岩崎雅宏	岩瀬春子	岩田 卓
宇佐美知香	碓井宏和	白田実男	内田克典	内山智子	梅澤 敬
浦野 誠	卜部省悟	榎木英介	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	大久保陽一郎	大河戸光章
大崎博之	大島健司	大城 久	大谷 博	太田浩良	大塚重則
大沼利通	大橋瑠子	大橋隆治	大原 樹	大森真紀子	小賀厚徳
緒方 衝	岡 俊郎	岡部義信	岡本 聡	岡本三四郎	岡本吉明
岡山香里	奥川 馨	小椋聖子	刑部光正	尾崎 敬	尾田三世
小田義直	小貫麻美子	小野里香織	小野瀬 亮	小山田裕行	小山徹也
甲斐敬太	利部正裕	香川聖子	柿沼廣邦	垣花昌俊	覚野綾子
笠井孝彦	風間暁男	梶原直央	梶原 博	片岡竜貴	片岡史夫
片倉和哉	片山博徳	加藤 拓	加藤智美	加藤友康	加藤久盛
門田球一	加戸伸明	金尾祐之	金山清二	金子真弓	金子佳恵
鹿股直樹	神尾多喜浩	川上 史	川越俊典	川崎朋範	川瀬里衣子
川西なみ紀	河野光一郎	河野哲也	河野裕夫	河原邦光	河村憲一
川本雅司	神田浩明	菊池 朗	木佐貫 篤	岸野万伸	岸本浩次
北澤莊平	北澤理子	木下勇一	木村文一	喜友名正也	京 哲
清川貴子	清永加菜	草苺宏有	草野弘宣	工藤明子	久布白兼行
熊木伸枝	久山佳代	倉重真沙子	栗田智子	黒田敬史	黒田直人
黒田 一	小池淳樹	孝橋賢一	小材和浩	小塚祐司	小林裕明
小林博久	小林佑介	小林陽一	小松宏彰	小宮山慎一	小山芳徳
近藤哲夫	近内勝幸	今野 良	齊尾征直	才 荷 翼	齋藤生朗
酒井康弘	坂谷貴司	坂本直也	坂本 優	嵯峨 泰	佐川元保
桜井孝規	笹川寿之	佐々木 優	佐々木素子	佐々木陽介	笹 秀典
佐治晴哉	佐藤慎也	佐藤誠也	佐藤正和	佐藤康晴	佐藤由紀子
郷久晴朗	塩澤 哲	洪田秀美	澁谷 潔	島田宗昭	清水和彦
清水 健	清水道生	清水禎彦	下釜達朗	白波瀬浩幸	菅井 有
須貝美佳	杉田好彦	杉本澄美玲	杉山朋子	杉山裕子	酒々井夏子

鈴木 淳	鈴木 直	鈴木雅子	鈴木正人	関田信之	芹澤昭彦
仙谷和弘	園田 顯三	駄阿 勉	高倉 聡	高瀬頼妃呼	高田恭臣
高野忠夫	高野浩邦	高野政志	高橋 顕雅	高橋恵美子	高橋 一彰
高橋美紀子	高橋芳久	高松 潔	田口健一	田口雅子	竹井裕二
竹島信宏	武田麻衣子	竹原和宏	田雑有紀	橘 啓盛	立山義朗
楯 玄秀	楯 真一	田中一朗	田中京子	田中尚武	田中綾一
棚田 諭	谷川輝美	田沼順一	田原紳一郎	玉手雅人	玉野裕子
筑後孝章	千酌 潤	千代田達幸	辻村 亨	津田 均	土田 秀
筒井英光	寺井義人	寺田倫子	寺戸信芳	寺畑信太郎	寺本典弘
寺本瑞絵	田路英作	徳田雄治	徳永英樹	戸澤晃子	栃木直文
富永英一郎	富安 聡	豊田進司	鳥居貴代	内藤子来	内藤嘉紀
中泉明彦	中尾佳史	中澤久美子	永沢崇幸	長嶋 健	中島正洋
永瀬 智	中塚伸一	仲村 勝	中山 淳	中山富雄	中山宏文
永山元彦	南部雅美	西尾 浩	錦見恭子	西野幸治	西村庸子
西村理恵子	西森 誠	西山憲一	丹羽憲司	布引 治	野島 聡
能登原憲司	野中道子	野村弘行	野本靖史	羽賀博典	橋口真理子
橋本大輝	長谷川清志	畑中一仁	秦 美暢	服部 学	羽原利幸
濱川真治	林 茂徳	林 真也	林 俊哲	原田憲一	坂東健次
阪埜浩司	東田太郎	東 美智代	樋口佳代子	飛田 陽	秀島克巳
姫路由香里	平井秀明	平沢 晃	平田哲士	平林健一	廣井禎之
福島裕子	福島万奈	福屋美奈子	藤井丈士	藤井智美	伏見博彰
藤山淳三	藤原寛行	二神真行	古田玲子	古旗 淳	星田義彦
細根 勝	堀江香代	堀 由美子	彭 為霞	前田純一	増田健太
増田しのぶ	町田知久	松井成明	松浦基樹	松坂恵介	松澤こず恵
松下倫子	松田育雄	松田勝也	松永 徹	松林 純	松本光司
松本慎二	松山篤二	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	南口早智子	南 優子	三村明弘
宮岡 雅	宮城 淳	三宅康之	宮崎龍彦	宮嶋葉子	宮本朋幸
村上 功	村田和也	村田晋一	村田哲也	最上多恵	元井 亨
元井紀子	許田典男	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	安永昌史	安原裕美子	矢田直美
谷田部 恭	柳川直樹	柳田 聡	柳谷典子	築詰伸太郎	矢野恵子
矢野博久	矢幡秀昭	山上 亘	山口知彦	山崎奈緒子	山下 博
山田恭輔	山田隆司	山田 隆	山田鉄也	山田範幸	山田麻里沙
山ノ井一裕	山本晃人	山元英崇	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 功	吉野 潔	米田 操
米山剛一	龍 あゆみ	梁 善光	和田直樹	渡辺寿美子	渡邊 みか
渡部 洋					

(50音順)



令和四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

〒100-10061 東京都千代田区神田駿河台二丁目一  
番一  
駿河台サンライズビル三階  
公益社団法人 日 本 臨 床 細 胞 学 会  
発行所  
電話〇三(五七七)四六八〇 振替〇〇一〇一〇一三三五四五