

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ~ 2009
 課題番号： 20790280
 研究課題名(和文) 液状処理細胞診を応用した甲状腺穿刺吸引細胞診の新しい細胞診断法の開発
 研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic method for fine needle aspiration cytology of thyroid using liquid based cytology
 研究代表者
 橋本 克訓 (HASHIMOTO KATSUNORI)
 名古屋大学・医学部(保健学科)・助教
 研究者番号：70324423

研究成果の概要(和文): 従来の細胞診断法(細胞診)は検査者の豊富な知識や経験を必要とする検査法であり、検査者間の判定誤差や誤診がしばしば問題となる。

本研究は検査者の主観によらない客観的な細胞診断法を検討した。細胞の大きさや形の不整さを詳細に計測する手法(形態計測)と、悪性細胞が高頻度に発現する物質を可視化し検出する手法(免疫細胞化学)を組み合わせると甲状腺病変のうち、悪性群(がん症例)と良性群(濾胞腺腫、腺腫様甲状腺腫、バセドウ病)を高い確率で分別可能であった。

研究成果の概要(英文): The conventional method of diagnostic cytology is the laboratory procedure to depend on knowledge and experience of cytopathologist and cytotechnologist, hence the problem such as inter-observer variability and false diagnosis may occur. To establish objective diagnostic method that was not based on the subjectivity of the investigator, this study assessed novel method that applied morphometric analysis and immunocytochemistry to LBC specimen of thyroid. This method was able to discriminate malignancy group (papillary carcinoma and follicular carcinoma) and benign group (follicular adenoma, adenomatous goiter and Basedow's disease) with high probability.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学、細胞診、甲状腺、液状処理細胞診

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞診は患者への侵襲が少なく標本作製が簡便、迅速な上、安価な検査法の一つである。近年は甲状腺、乳腺、唾液腺などに発生した腫瘍に注射針ほどの細い針を穿刺し、病変部より少量の細胞を吸引して検体を得る穿刺吸引細胞診が行われている。(2) 細胞診は形態学的検査であり細胞の良性、悪性の判定は検査者の知識、経験によることが大きい。また、異型の乏しい悪性細胞も少なからず存在し、良性との鑑別が非常に難しい症例もある。主観によるところの大きい形態学的検査では検査者間での判定誤差や同一検査者においても様々な要因で判定のゆらぎが生じ、最悪の場合は誤診につながることもありうる。(3) 細胞診はがん細胞の浸潤や脈管への侵襲、転移の評価が不可能であり、生検や手術検体を対象にした病理組織診断に委ねられている。特に生検が不可能な甲状腺ではこの点が最も問題となっており、甲状腺腫瘍のうち、悪性の濾胞癌と良性の濾胞腺腫は細胞の形態のみでは鑑別不可能で、細胞診では両者を濾胞性腫瘍に一括し報告することになっている。細胞診などで濾胞性腫瘍と診断された場合は甲状腺切除を行い、病理組織診で甲状腺組織の皮膜への浸潤、脈管への侵襲が確認されれば濾胞癌、確認されなければ濾胞腺腫と初めて診断される。濾胞腺腫は多くの場合、甲状腺切除は不要であるので術前に両者を正確に診断できる方法の確立が必要である(4) 近年、婦人科細胞診をはじめと液状処理細胞診(Liquid-based cytology; LBC)が普及しつつある。これは採取した細胞を保存・固定液に浮遊させた後、遠心法などで集細胞してからスライドガラスに塗抹して標本作製する方法である。採取細胞を直接スライドガラスに塗抹する従来法と比較すると、細胞の固定前乾燥による細胞変性が生じない。作製した標本が観察しやすい。細胞の保存が可能。複数の標本作製が可能。遺伝子学的な応用が可能。という利点があり今後は細胞診の主流となり様々な検体に応用されると思われる。

以上の背景から甲状腺細胞診にLBCを応用した客観的な細胞診断法を開発する基礎的な研究を行った。

2. 研究の目的

LBC標本を用いた客観的な細胞診断を行うための基礎的な検討が本研究の目的である。

(1) 甲状腺細胞診にLBCが応用可能であるかを検討し、従来法とLBC法での細胞像の差異、LBC法の特徴(細胞像、保存性、免疫細

胞化学的特性)を検証する。

(2) 細胞を形態計測し、様々な甲状腺病変の細胞の様々な計測データを蓄積し、疾患間で有意差のある計測項目を統計学的に確認するとともに、形態計測値による疾患の鑑別が統計学的に可能であるかを検討する。

(3) 免疫細胞化学的手法である酵素抗体法をLBC標本に応用し、甲状腺病変の鑑別に有用であるかを検討する。

(4) 形態計測と免疫細胞化学的手法を用いて総合的な甲状腺病変の鑑別法を構築する。

3. 研究の方法

(1) 対象: 研究対象の検体は手術で摘出された甲状腺病変の断面を擦過し細胞を採取しLBC保存固定液(Liqui-Prep™, LGM International Inc.)に浮遊させ保存し、LBC標本作製し、通常のPapanicolaou染色、酵素抗体法に用いた。今回の研究で用いた症例は乳頭癌(papillary carcinoma: PC)55例、濾胞腺癌(follicular carcinoma: FC)2例、濾胞腺腫(follicular adenoma: FA)16例、腺腫様甲状腺腫(adenomatous goiter: AG)、バセドウ病(Basedow's disease: BD)3例である(表1)。LBC標本作製に関してはメーカーの仕様書どおり実施した。

表1. 症例一覧

症例	症例数(男)	年齢(平均)
悪性群		
PC	55(11)	25-83(55.9)
FC	2(0)	28-62(45.0)
良性群		
FA	16(2)	30-80(52.9)
AG	37(10)	22-74(54.0)
BD	3(1)	48-74(58.3)
計	113(24)	22-83(54.8)

(2) LBC法と従来法との細胞像の比較: LBC法と従来法との細胞像の差異を形態計測を行い詳細に検討した。上記症例のうち甲状腺病変の手術材料20例(表2)の断面を擦過して細胞を採取しLBC用保存固定液に浮遊させた。また、従来法として病変部の捺印標本作製し95%エタノール固定した。作製したLBC標本、捺印標本はPapanicolaou染色を行い、顕微鏡デジタル撮影装置で細胞画像を取得後、画像解析ソフトウェア(ImageJ, NIH, USA)を用いて形態計測を行なった。形態計測は標本中の細胞100個以上について核と細胞質のそれぞれ面積、周囲長、最大径、形状係数(円形度)を測定し、さらに核/細胞質比(N/C比)を求めた。症例ごとに集計し統計学的な解析を行った。

表 2. 細胞像の比較に用いた症例

	数(男)	年齢(平均)
PC	10(3)	25-64(46.3)
AG	10(4)	36-73(55.1)

(3)LBC用保存固定液中の経時的な細胞変化の検討

上記症例のうち甲状腺乳頭癌の手術材料 20 例の断面を擦過して細胞を採取し LBC 用保存固定液に浮遊させた。同時に病変部の擦過・捺印標本を 95%エタノール固定し従来法とした。LBC 保存固定液中での経時的細胞形態の変化をみるために標本作製を当日と 1 週間後、4 週間後に行なった。作製した標本は Papanicolaou 染色などを行い、上記の方法と同様に形態計測を行った。

表 3. LBC 保存の経時的な形態変化の検討に用いた症例

症例	数(男)	年齢(平均)
PC	20(4)	25-83(53.7)

(4) 免疫細胞化学的検討

症例 113 例(表 1)の症例に対して甲状腺病変の鑑別に有用との報告のある 6 種類の抗体(表 4)を用いて酵素抗体法を実施した。LBC 標本を 0.3%過酸化水素加メタノールで 20 分間処理して内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った後、流水中で親水化、pH7.2, 10mM PBS に 3 分間浸漬した。10%正常ヤギ血清を標本上に滴下し室温 20 分間インキュベート後、一次抗体を 4 で一晩反応させた。PBS で 5 分間、3 回洗浄後、酵素標識 2 次抗体、Histofine Simple Stain MAX PO (M) (Nichirei Biosciences Inc.) を室温で 30 分間反応。PBS 洗浄 5 分間、3 回洗い、DAB 発色基質 Vector DAB substrate kit (VECTOR LABORATORIES, INC.) を用い 1 分間発色後、ヘマトキシリンで後染色した。上昇エタノール系列で脱水後、透徹、封入した。

標本中の全視野を観察し、陽性細胞の割合によって次のように判定量評価した。(-); 0%, (+); < 10%, (2 +); 10-50%, (3 +); > 50。疾患ごとの各抗体の陽性率と、これらの抗体を悪性群で陽性となるマーカーとした時の感度、特異度、診断確度を算出した。

表 4. 酵素抗体法に用いた抗体一覧

抗体名	メーカー	クローン名	希釈倍率	前処理
Galectin-3	Novocastra	NCL-GAL3	200	
CD15	BD	MMA	50	
高分子量サイトケラチン	Dako	34 E12	50	AC
HBME-1	Dako	HBME-1	50	
CA19-9	Dako	NS19-9	50	
CK19	Dako	RCK108	200	AC
上皮抗原	Dako	Ber-EP4	100	

AC: 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0)、オートクレーブ20分間処理

4. 研究成果

(1) 従来法をと LBC 法との比較

乳頭癌(PC)と腺腫様甲状腺腫(AG)の細胞像の形態計測値を表 5、表 6 にまとめた。有意差のある計測項目は、核円形度、核最大径、N/C 比であった(図 1-3)。これらの項目間の相関を調べるため、散布図を作成した(図 4-6)。散布図より PC と AG の分布がある程度分離する傾向が判明した。

表 5. 形態計測結果(従来法)

症例		核				N/C
		面積(μm ²)	周囲長(μm)	円形度	最大長(μm)	
PC	平均	44.73	24.50	0.918	8.83	
	SD	5.319	1.277	0.017	0.390	
		細胞質				
	平均	105.08	38.96	0.857	14.708	0.438
	SD	12.292	2.310	0.030	0.938	0.024
		核				
		面積(μm ²)	周囲長(μm)	円形度	最大長(μm)	
AG	平均	37.73	22.09	0.946	7.69	
	SD	7.896	2.321	0.009	0.822	
		細胞質				
	平均	106.79	39.34	0.846	14.857	0.371
	SD	25.593	4.871	0.018	1.903	0.050

表 6. 形態計測結果
(LBC 法の結果と従来法との比較)

症例		核				N/C
		面積(μm ²)	周囲長(μm)	円形度	最大長(μm)	
PC	平均	30.85	20.81	0.885	7.67	
	SD	2.162	0.758	0.014	0.302	
	比較(%)	69.5	84.9	96.4	86.8	
		細胞質				
	平均	75.95	33.66	0.837	12.923	0.421
	SD	6.032	1.875	0.045	0.961	0.029
	比較(%)	73.0	86.4	97.8	87.9	96.1
		核				
		面積(μm ²)	周囲長(μm)	円形度	最大長(μm)	
AG	平均	28.37	19.41	0.930	6.92	
	SD	5.581	1.931	0.018	0.779	
	比較(%)	75.6	87.9	98.3	90.0	
		細胞質				
	平均	80.21	34.21	0.848	13.038	0.371
	SD	17.079	3.897	0.023	1.606	0.043
	比較(%)	76.2	87.0	100.3	87.8	100.0

比較(%)は従来法の値を100としたときのLBC法の値

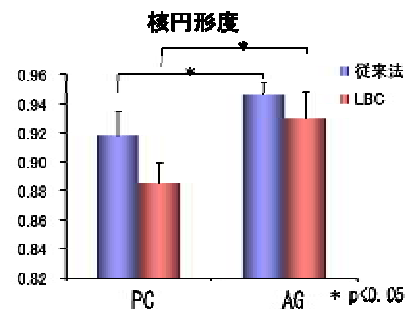


図 1. 核円形度の比較

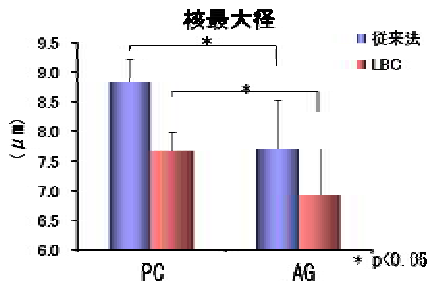


図2. 核最大径の比較

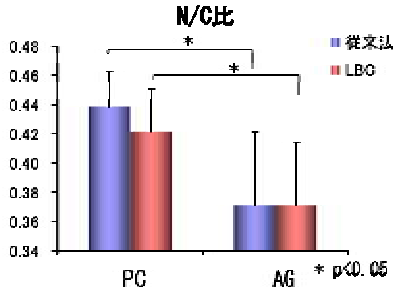


図3. N/C比の比較

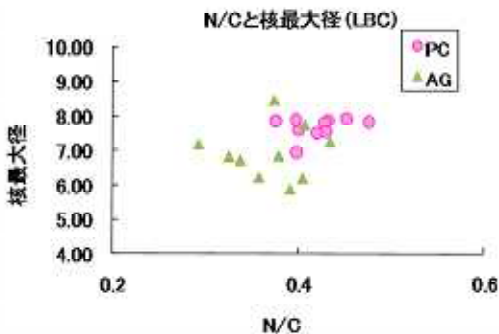


図4. N/C比と核最大径との相関図

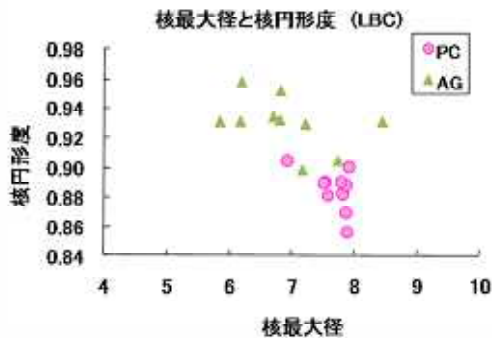


図5. 核最大径と核円形度の相関図

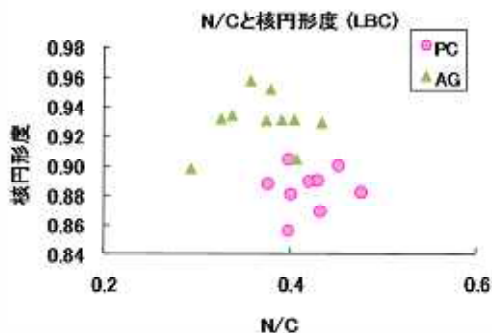


図6. N/C比と核円形度の相関図

従来法と比較するとLBC法では各項目の計測値が低下し細胞の収縮が顕著であった。さらにPCとAGを比較すると各項目ともPCの低下率がAGよりも高く、特に核面積の低下がPCでより顕著であったが統計学的な有意差は認められなかった(図7)。

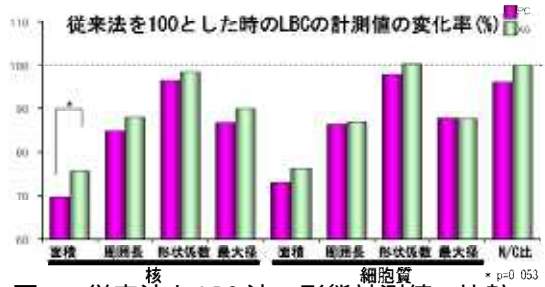


図7. 従来法とLBC法の形態計測値の比較

(2) LBC用保存固定液中での経時的な細胞の形態学的な変化

LBC用保存固定液中での経時的な細胞変化を形態計測を用いて詳細に検討した。結果の一部を図8-12に示す。

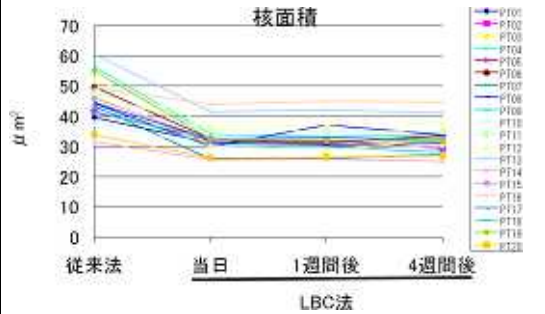


図8. 核面積の経時的変化

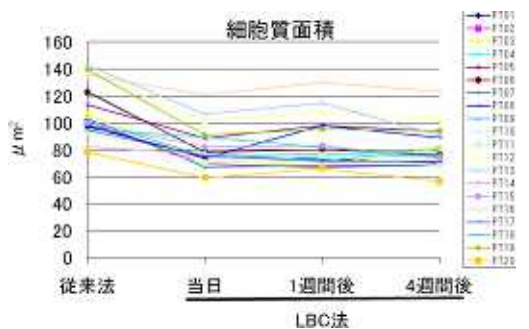


図9. 細胞質面積の経時的変化

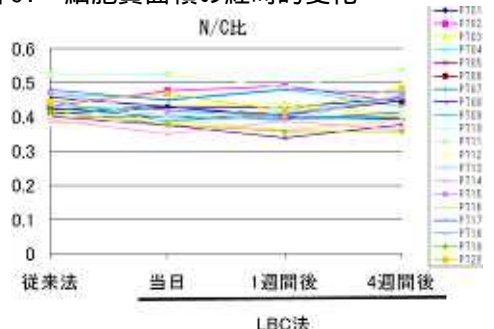


図10. N/C比の経時的変化

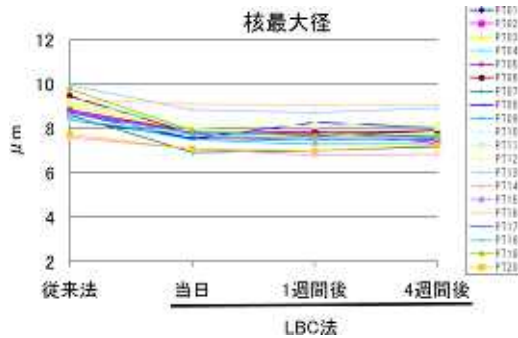


図 11. 核最大径の経時的変化

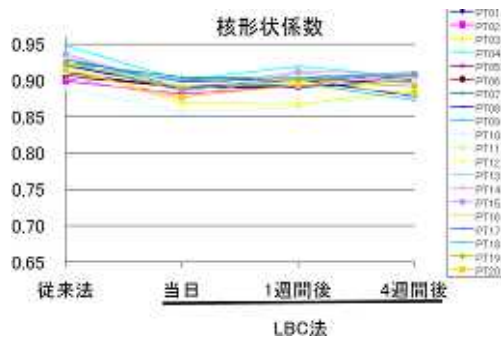


図 12. 核形状係数 (円形度) の経時的変化

1 週間後、4 週間後の計測値に有意な変化は認められず、LBC 用保存固定液中で 4 週間にわたり安定に保存されることを形態計測的に実証した。また、データには示さないが、96 週間保存した検体の細胞像も鏡検には支障のない像であった。また、上皮抗原に対する抗体 (Ber-EP4) を用いた酵素抗体法で陽性が確認できたため、免疫細胞化学的にも安定に保存可能であることが示唆された。

(3) 甲状腺病変の LBC 検体の形態計測と酵素抗体法の結果

以上の結果をふまえて、甲状腺症例 113 例の LBC 標本に対して形態計測と酵素抗体法を行い、甲状腺病変の鑑別診断を検討した。

形態計測

形態計測の結果を表 7 に示す。なお、これまでの検討より細胞鑑別に有用と思われる計測項目のみ提示する。

表 7. 甲状腺病変 113 例の形態計測結果

計測項目	症例 (数)	悪性群		良性群		
		PC (55)	FC (2)	FA (16)	AG (37)	BD (3)
核面積 (μm ²)	平均	34.41 ± 5.380	31.97 ± 2.520	30.11 ± 5.214	30.30 ± 5.843	23.00 ± 4.534
	変動係数	0.24 ± 0.047	0.23 ± 0.046	0.21 ± 0.029	0.25 ± 0.075	0.22 ± 0.009
核円形度	平均	0.88 ± 0.015	0.91 ± 0.070	0.93 ± 0.010	0.92 ± 0.018	0.93 ± 0.011
	変動係数	0.06 ± 0.011	0.05 ± 0.007	0.03 ± 0.007	0.04 ± 0.015	0.03 ± 0.006
核最大径 (μm)	平均	8.02 ± 0.608	7.44 ± 0.222	6.97 ± 0.650	7.12 ± 0.737	6.15 ± 0.488
	変動係数	0.13 ± 0.025	0.12 ± 0.011	0.11 ± 0.011	0.13 ± 0.040	0.12 ± 0.014
N/C 比	平均	0.44 ± 0.041	0.37 ± 0.110	0.37 ± 0.050	0.36 ± 0.053	0.36 ± 0.042
	変動係数	0.20 ± 0.031	0.22 ± 0.024	0.23 ± 0.086	0.24 ± 0.049	0.22 ± 0.034

PC: 乳頭癌、FC: 濾胞癌、FA: 濾胞腺腫、AG: 腺腫様甲状腺腫、BD: パセドウ病
各値は平均 ± 標準偏差で示した。

これらの計測値を統計学解析ソフトウェア (SPSS ver. 14.0J) を用いて多変量解析の一つである線形判別分析を行った。

はじめに線形判別分析が可能か共分散行列の相等性の検定として Box の M 検定を行い線形判別分析が可能かを確かめた。5 つの疾患群に分けて、表 7 の全ての形態計測値を入力したところ、分散共分散行列の相当性が保証されない結果となった。そこで分析可能な疾患群分けと変数 (計測項目) の選択を検討した。疾患群を悪性群と良性群の 2 群とし、変数を核面積変動係数、核円形度平均、核最大径平均、N/C 比平均の 4 つで分析した。判別分析の結果を表 8 に示す。悪性群の乳頭癌は全て悪性と予測されたものの、濾胞癌 2 例のうち 1 例は良性とされた。良性群では濾胞腺腫とパセドウ病は全て良性と判別されたが、腺腫様甲状腺腫の 4 例は悪性と判別された。感度 98.2% (56/57)、特異度 92.9% (52/56)、診断確度 95.6% (108/113) と高い判別率であった。

表 8. 判別分析結果

	症例	判別分析による予測結果		
		悪性 (%)	良性 (%)	合計 (%)
悪性群	PC	55 (100.0)	0	55 (100.0)
	FC	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (100.0)
良性群	FA	0	16 (100.0)	16 (100.0)
	AG	4 (10.8)	33 (89.2)	37 (100.0)
	BD	0	3 (100.0)	3 (100.0)

PC: 乳頭癌、FC: 濾胞癌、FA: 濾胞腺腫、AG: 腺腫様甲状腺腫
BD: パセドウ病

免疫細胞化学 (酵素抗体法)

甲状腺病変の鑑別に有用との報告のある 6 種の抗体を用いた結果を表 9 に示し、各抗体が悪性群に陽性となるマーカーとした場合の感度、特異度、診断確度を表 10 に示す。

全ての抗体で乳頭癌例の陽性率が高い (89.1-100%) もの、良性群の疾患でも一部に陽性となるものがあつた。

乳頭癌 (PC) において 6 種の抗体のうち 2 種以上の抗体で陰性となる例はなかった。また、良性群で 6 種全てに陽性を示した症例は腺腫様甲状腺腫 (AG) の 1 例のみであった。

表 9. 甲状腺病変 113 例の酵素抗体法の結果

症例	悪性群			良性群			
	PC	FC	計	FA	AG	BD	計
症例数	55	2	57	16	37	3	56
34 E12	54 (98.2)	0 (0.0)	54 (94.7)	3 (18.8)	8 (21.6)	0 (0.0)	1 (19.6)
GAL-3	51 (92.7)	0 (0.0)	51 (89.5)	0 (0.0)	9 (24.3)	0 (0.0)	9 (16.1)
陽性数 CD15	55 (96.5)	0 (0.0)	55 (96.5)	6 (37.5)	11 (29.7)	0 (0.0)	7 (30.4)
(%) CA19-9	49 (89.1)	0 (0.0)	49 (86.0)	1 (6.3)	12 (32.4)	0 (0.0)	3 (23.2)
CK19	55 (100.0)	2 (100.0)	57 (100.0)	10 (62.5)	18 (48.6)	0 (0.0)	8 (50.0)
HBME-1	55 (100.0)	1 (50.0)	56 (98.2)	7 (43.8)	10 (27.0)	1 (33.3)	8 (32.1)

PC: 乳頭癌、FC: 濾胞癌、FA: 濾胞腺腫、AG: 腺腫様甲状腺腫、BD: パセドウ病
34 E12: 高分子量サイトケラチン、GAL-3: Galectin-3

表 10. 各抗体の感度、特異度など

抗体	陽性数/症例数 (%)		感度	特異度	診断精度 (%)
	悪性	良性			
34 E12	54/57 (94.7)	11/56 (19.6)	94.7	80.4	87.6
Gal-3	51/57 (89.5)	9/56 (16.1)	89.5	83.9	86.7
CD15	55/57 (96.5)	17/56 (30.4)	96.5	69.6	83.1
CA19-9	49/57 (86.0)	13/56 (23.2)	86.0	76.8	81.4
CK19	57/57(100.0)	28/56 (50.0)	100.0	50.0	75.2
HBME-1	56/57 (98.2)	18/56 (32.1)	98.2	67.9	65.5

診断精度：真陽性数 + 真陰性数 / 全検査対象数

形態計測の判別分析で悪性と予測された腺腫様甲状腺腫 4 例のうち 6 種の抗体で全て陽性となった例は 1 例のみであり、その他 3 例は悪性を除外可能であった。

本研究期間中、濾胞癌は 2 症例しか収集できなかった。濾胞癌、濾胞腺腫の形態計測、免疫細胞化学的所見の比較はデータが不十分であり不可能であった。

今後の展望と課題

症例の蓄積と判別分析に有用な形態計測値の検討、さらに甲状腺病変の鑑別に有用な細胞マーカー（抗体）の検討が必要である。

濾胞性腫瘍の症例を蓄積し甲状腺病変の診断、特に細胞診では困難である濾胞癌、濾胞腺腫の鑑別を可能とする細胞マーカーの検索を続ける予定である。

LBC 保存・固定液の組成はアルコールが主成分でホルマリン固定・パラフィン切片よりも核酸の保持が良好であると思われる。今後、核酸レベルの検討（mRNA を検出する RT-PCR 法や、染色体数や特定の遺伝子の増幅・欠失を検出する fluorescence in situ hybridization ; FISH 法）を計画している。（FISH 法の予備実験は成功している）

形態計測に関しては核の染色性（クロマチン濃度、分布など）を画像解析法を用いて客観的に測定する方法の検討を行い、本研究で行った形態計測値による判別分析の変数に加えて判別精度の向上を目指す。

結語：近年普及しつつある LBC 法は従来の 95%エタノール固定法と比し、細胞の大きさが 70%程度委縮し核異形の程度が強くなる傾向があることを形態計測によって明らかとした。LBC 法ではこのように細胞形態が変化することを念頭においてスクリーニングする必要がある。LBC 用保存固定液中での細胞形態は長期間保存後も変化が生じず安定に保存可能であった。判定が難しい細胞検体に関しては後日、Papanicolaou 染色を再度行うことや、免疫細胞化学や各種特殊染色への

応用が可能であり、細胞診の正診率向上の寄与が期待できる。

LBC 標本の細胞像の形態計測データを多変量解析の 1 つである判別分析で解析すると甲状腺病変の悪性、良性を高い確率で判別可能であった。また、免疫細胞化学的手法である酵素抗体を 6 種の抗体で実施したところ、全ての抗体の感度は高いものの特異度は低かった。形態計測の判別分析と免疫細胞化学の結果を組み合わせると悪性、良性の判別精度が向上した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕(計 5 件)

橋本 克訓 他、甲状腺乳頭癌の形態計測的解析（液状処理細胞診と従来法との比較）、第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会、2009 年 10 月 31 日、JAL シーホークホテル福岡（福岡市）

森本 亜由美、橋本 克訓 他、液状処理細胞診検体を用いた腹水腺癌細胞と中皮細胞の免疫組織学的検討、2009 年 10 月 31 日、JAL シーホークホテル福岡（福岡市）

橋本 克訓 他、液状処理細胞診における甲状腺病変の細胞像の形態計測的解析、第 56 回日本臨床検査医学会学術集会、2009 年 8 月 28 日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

橋本 克訓 他、液状処理細胞診を用いた甲状腺病変の免疫細胞化学的、形態計測的鑑別診断の基礎的研究、第 47 回日本臨床細胞学会秋期大会、2008 年 11 月 14 日、グランドプリンスホテル高輪（東京都港区）

Ayumi Morimoto, Katsunori Hashimoto, Toyoharu Yokoi, et al., Morphometric and FISH analysis of mesothelial cells and adenocarcinoma using LBC., The 15th Japan-Thai International Cytology Workshop., Nov. 14, 2008, (Tokyo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 克訓 (HASHIMOTO KATSUNORI)
名古屋大学・医学部（保健学科）・助教
研究者番号：70324423