

クリニカルカンファレンス7 子宮頸部細胞診

2) 液状検体細胞診

座長：金沢大学
井上 正樹東邦大学医療センター大橋病院
久布白兼行筑波大学
吉川 裕之

はじめに

液状検体細胞診(Liquid-based cytology : LBC 法と略す)は採取した細胞を専用の保存液バイアルに回収し細胞浮遊液として保存した後、専用の機器を用いて細胞診標本作製する方法である。LBC 法が行われるようになった歴史的背景として、1980年代後半、米国で細胞診の精度について社会問題となったことが上げられる。このことが発端となり、米国においてベセスダシステムが公表され、一方、細胞診の精度向上を図るため細胞診と HPV 検査の併用、スクリーニングの自動化、液状処理検体の推進などの改善策が講じられた。つまり LBC 法は従来法と比べ、細胞診標本の不適正が減少し、また精度向上が期待され登場した細胞診標本方法である。本稿では、LBC 法の標本作製方法、細胞診判定の評価、LBC 検体を用いた HPV 検査や免疫細胞化学の応用について述べる。

LBC 法の標本作成法と細胞所見

図1に直接塗抹法(従来法)と LBC 法の子宮頸部からの細胞採取から診断までの流れを示す。従来法では細胞採取後、スライドガラスへ細胞を塗抹し固定し、その後検査室で染色から検鏡、診断が行われる。一方、LBC 法では細胞を採取後、専用の保存液バイアルへ細胞を入れ、その後、バイアルは検査室で専用の機器を用いて細胞塗抹から診断までが行われる。つまり従来法では臨床医は細胞採取から固定までを行うのに対し、LBC 法では臨床医は細胞採取と細胞浮遊液の作製のみを行うことになる。したがって LBC 法では標本の作製が均一化・標準化されることになり、その結果として不適正標本が減少することが期待できる。なお、LBC 法にあたっては、細胞診採取器具はブルーム型ブラシであるサーベックスブラシが推奨されている。

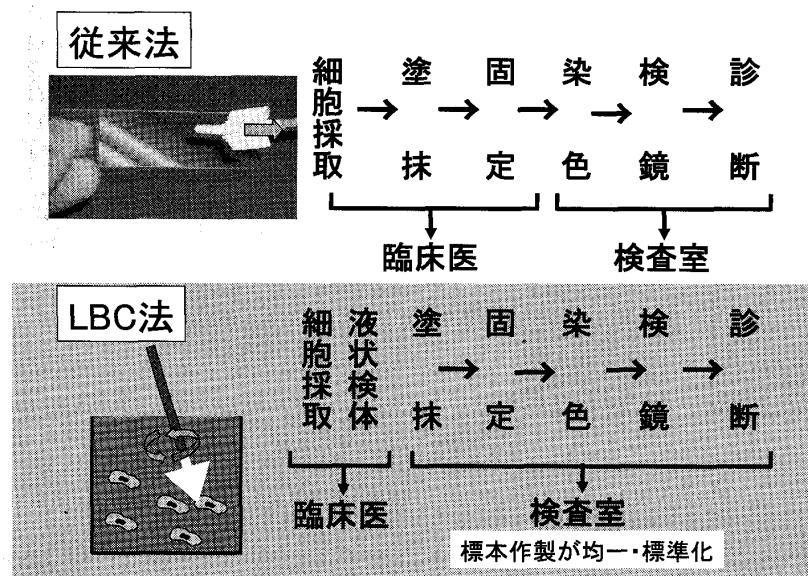
さて、現在普及している LBC 法には ThinPrep 法、SurePath 法、TACAS 法がある。

Liquid-based Cytology Uterine Cervix

Kaneyuki KUBUSHIRO

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Toho University Ohashi Medical Center, Tokyo

Key words : Liquid-based cytology · Cervical cancer · HPV (human papillomavirus) · Immunocytochemistry · P16



従来法では細胞採取から固定まで臨床医が行う、LBC法では臨床医は細胞採取のみ行う

(図1) 従来法とLBC法における細胞採取から診断までの流れ

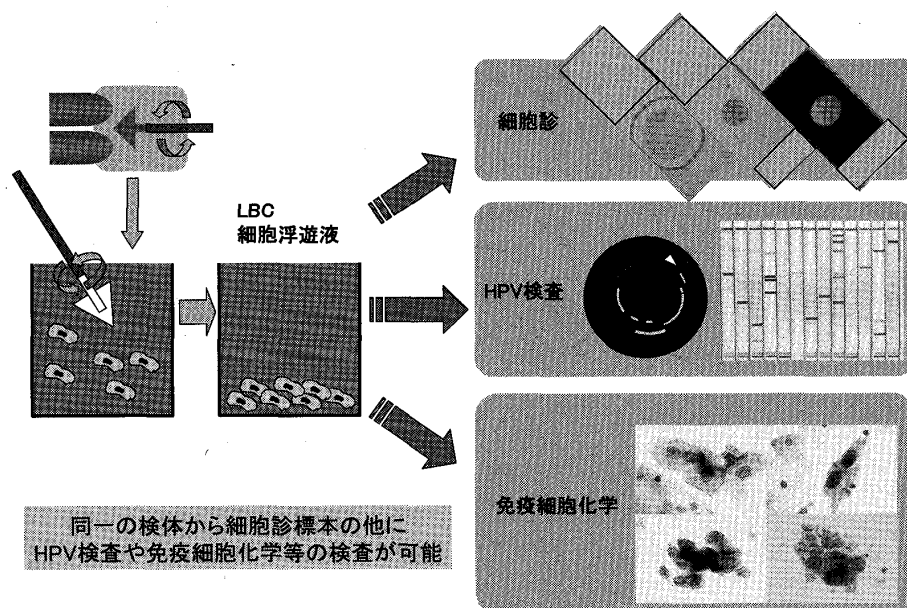
これら3種類のLBC法はそれぞれ標本作製する原理が異なる。ThinPrep法は専用フィルターを用いて細胞を回収し、その後スライドガラスに転写・塗抹する。SurePath法は分離剤を添加して密度勾配法によって血清を分離し必要な細胞を集め、その後細胞を専用のスライドガラスに塗抹する。またTACAS法は、遠心して診断に必要な細胞を集めた後、専用のスライドガラスへ細胞吸着ポリマーによって沈降細胞を塗抹するという原理で標本作製する。こういった標本作製原理の相違がLBC法によってそれぞれ特徴のある細胞所見を呈することに影響を与えている。

またLBC法は一度細胞浮遊液を作製すると、細胞診標本の作製に加えて同一の検体からHPV検査や各種の免疫細胞化学などの検索を行うことが可能であるというメリットを有する(図2)。すなわち患者から一度の検体採取を行うことによって、以上の検査を実施することができる。一方、標本作製に専用の機器や保存液等の消耗品が必要であること、また従来法に比べ標本作製の手間や費用がかかることがデメリットと考えられる。

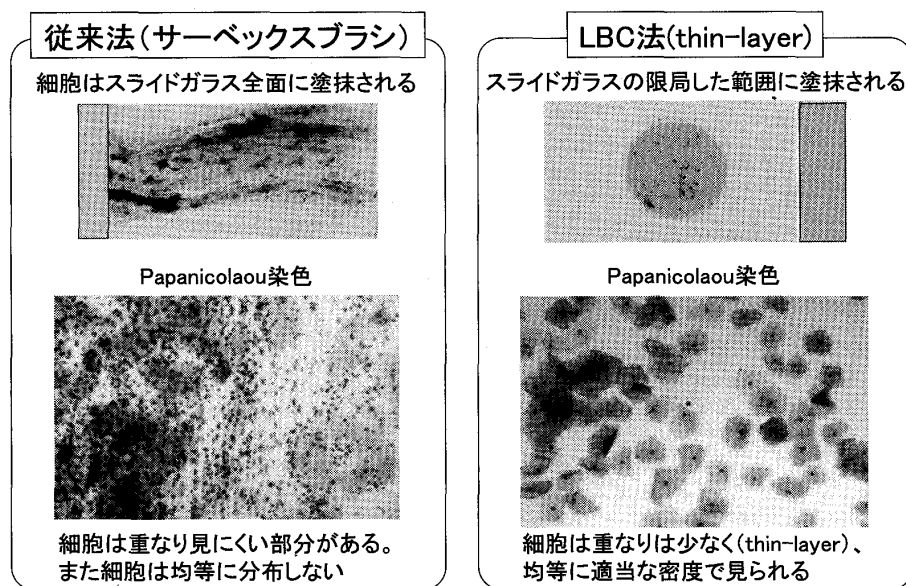
従来法とLBC法によってそれぞれ作製されたガラス標本と検鏡した際の細胞所見を比較すると、従来法では細胞はスライドガラス全面に塗抹されるので、スライドガラス全体を検鏡することが必要である。また細胞像は重なり見にくい部分があり、分布は均等になりにくい傾向がある。一方LBC法で作製された細胞診標本では、細胞は限局した円形の範囲に塗抹され、また細胞は重なりが少なく、均等な密度で見られる(図3)。このように現在普及しているLBC法は細胞の重なりが少ないことから、thin-layer標本とも呼ばれる。但しLBC法の細胞像は従来法と異なる点もあり、検鏡に際しては細胞像の読みに習熟を必要とする。

LBC法と従来法の細胞診の比較

LBC法を用いると従来法に比べ細胞診断の精度が向上するか、については数多くの検討が行われている。当初LBC法はHSILに対する検出率は従来法に比べ高率になるという報告が見られたが、いくつかのランダム化比較試験^{1)~6)}やメタアナリシス⁷⁾⁸⁾では、LBC



(図2) LBC法の細胞浮遊液検体の活用



(図3) 従来法とLBC法の標本

法と従来法の感度や陽性的中率はほぼ同等であるとする報告が多くなっている。一方、最近の報告においても CIN2以上を中心に LBC 法は従来法に比べ高くなるものも散見される⁹⁾ことから、現在のところ、LBC 法は従来法に比べ CIN2以上に対する感度は少なくとも同等あるいはやや上回ると考えられる。我々は従来法と LBC 法で同一症例から採取した細胞診標本を従来法と LBC 法の両者で作製し、細胞診判定を比較している。その結果、今までの検討では従来法と LBC 法の間で CIN2以上の感度に有意差は認めていない¹⁰⁾。しかし、従来法と LBC 法の細胞診判定の比較研究では、研究デザインの設定が本来はランダム化比較試験が望ましいが、必ずしも容易ではない。そこで同一症例から従

来法とLBCの両者を作製し比較する方法が用いられることが少なくない。以上述べたようにLBC法と従来法の比較検討については、多くの解析がなされているが、その成績の評価は研究デザインを含めて注意深く検証する必要がある。

LBC検体を用いたHPV検査

通常、HPV検査は子宮頸部擦過検体を用いて行われる。一方、LBC法で細胞診標本を作製した後、残存する検体を用いてHPV検査を実施することも可能である。すなわちLBC法で細胞診を行った後、受診者から再度HPV検査用の検体を採取することなく、LBC検体からHPV検査を行うことができる。また近年HPV検査でスクリーニングした後に症例を選択して細胞診を実施するという考え方がある¹¹⁾。このスクリーニング形式の場合、LBC法で検体を採取していればHPV検査を施行後、同一のLBC検体から細胞診を行うことも可能になる。こういったLBC検体を用いたHPV検査を実施するにあたっては、細胞浮遊液検体の保存条件等に関する検討が必要である。現在のところ、米国FDAはLBC検体を用いたHPV検査は、ThinPrep法について承認している。ThinPrep法の検体を用いてHPV高リスク型一括検査であるHC-2法、またHPV genotyping検査をdirect sequencing法を行うと、浸潤癌ではHPV16型、18型のほかに56型や58型が高頻度に検出される¹²⁾。またTACAS法に関しては、HPV検査の適切な細胞浮遊液検体の保存温度、保存期間などはこれからの検討が必要である。

LBC法によってHPV検査を実施するための適切な保存温度、保存期間は異なるので、LBC保存液中でのHPV DNAの変性の可能性などを含めて確認しておくことは重要である。

LBC検体を用いた免疫細胞化学への応用

LBC検体を用いて細胞診に加えてHPV検査、そして免疫細胞化学などの検索が可能である。同一症例について細胞診と同時に免疫細胞化学が実施できれば、細胞診の補助診断として有用となる可能性がある。P16は子宮頸部腫瘍のバイオマーカーとして有用であることが知られている。我々は子宮頸部腫瘍におけるP16過剰発現の検索を免疫組織化学にて検討した結果、異形成では異型細胞のみに一致して、扁平上皮癌や腺癌ではがん細胞のみに一致してP16の過剰発現が見られることを確認している^{13)~15)}。一方P16免疫細胞化学では、扁平上皮系の異型細胞で陽性となり軽度異形成、中等度異形成、高度異形成と上皮内癌で、それぞれ核と細胞質が染色される。そして組織診断とP16免疫細胞化学の結果を比較すると、過剰発現の頻度は軽度異形成、中等度異形成、高度異形成、上皮内癌と病変の進行に伴って増加する¹⁶⁾。このようにP16免疫細胞化学の結果は、研究免疫組織化学におけるP16過剰発現の頻度と同様に病変の進行に伴ってその頻度は増加し、免疫組織化学と免疫細胞化学におけるP16過剰発現の頻度は類似した傾向がみられる。

おわりに

液状検体細胞診は標本作製の方法が均一化されることから、従来法に比べ不適正標本が減ることが期待できる。また細胞診と同時にHPV検査が実施可能であることはメリットといえよう。さらに今後の展望として細胞診の自動化スクリーニングへの活用もあり、我が国での液状検体細胞診の普及を期待したい。

謝 辞

発表の機会をお与え下さいました学術集会長の獨協大学 稲葉憲之教授, 座長の労をおとり頂きました京都大学 井上正樹教授, 筑波大学 吉川裕之教授に深く感謝申し上げます。

共同研究者

東邦大学医療センター大橋病院産婦人科

田岡英樹, 浅川恭行, 山本泰弘, 櫻井信行, 福田麻実, 倉崎昭子

東邦大学医療センター大橋病院病理部

高橋 啓, 大原関利章, 横内 幸, 田口勝二, 岩原 実, 藤田正志, 村石佳重, 川畑智子

《参考文献》

1. Siebers AG, Klinkhamer PJ, Arbyn M, Raifu AO, Massuger LF, Bulten J. Cytologic detection of cervical abnormalities using liquid-based compared with conventional cytology : a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2008 ; 112 : 1327—1334
2. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C, Ghiringhello B, Giorgi-Rossi P, Minucci D, Parisio F, Pojer A, Schiboni ML, Sintoni C, Zorzi M, Segnan N, Confortini M. Accuracy of liquid based versus conventional cytology : overall results of new technologies for cervical cancer screening : randomised controlled trial. *BMJ* 2007 ; 335 (7609) : 28
3. Strander B, Andersson-Ellström A, Milsom I, Rådborg T, Ryd W. Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program : a prospective randomized study. *Cancer* 2007 ; 111 : 285—291
4. Taylor S, Kuhn L, Dupree W, Denny L, De Souza M, Wright TC Jr. Direct comparison of liquid-based and conventional cytology in a South African screening trial. *Int J Cancer* 2006 ; 118 : 957—962
5. Siebers AG, Klinkhamer PJ, Grefte JM, Massuger LF, Vedder JE, Beijers-Broos A, Bulten J, Arbyn M. Comparison of liquid-based cytology with conventional cytology for detection of cervical cancer precursors : a randomized controlled trial. *JAMA* 2009 28 ; 302 : 1757—1764
6. Sykes PH, Harker DY, Miller A, Whitehead M, Neal H, Wells JE, Peddie D. A randomised comparison of SurePath liquid-based cytology and conventional smear cytology in a colposcopy clinic setting. *BJOG* 2008 ; 115 : 1375—1381
7. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology : a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2008 ; 111 : 167—177
8. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, Saville AM. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology : a systematic review. *Lancet* 2006 Jan 14 ; 367 : 122—132
9. Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol Oncol* 2009 ; 112 : 572—

576

10. Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Mukai M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. Papanicolaou tests and molecular analyses using new fluid-based specimen collection technology in 3000 Japanese women. *Br J Cancer* 2003 ; 88 : 1883—1888
11. Wright TC Jr. Cervical cancer screening in the 21st century : is it time to retire the PAP smear? *Clin Obstet Gynecol* 2007 ; 50 : 313—323
12. Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Mukai M, Ono A, Iwata T, Kubushiro K, Nozawa S. Dominant human papillomavirus 16 infection in cervical neoplasia in young Japanese women ; study of 881 outpatients. *Gynecol Oncol* 2004 ; 94 : 509—514
13. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, Tsukazaki K, Mukai M, Nozawa S. Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006 ; 16 : 347—353
14. Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Susumu N, Mukai M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 2003 ; 34 : 778—783
15. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N, Saito M, Mukai M, Nindl I, Ridder R, Fukuchi T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003 ; 22 : 378—385
16. 久布白兼行. 子宮頸部初期病変に対する新しい診断システムの開発と妊孕能温存治療の適応拡大に関する研究. *日産婦誌* 2006 ; 58 : 1760—1768