

第31回奈良県臨床細胞学会学術集会

日時：平成28年12月3日(土)

午後2時10分～5時20分

場所：奈良県医師会館

第31回学術集会担当世話人 清塚康彦（きよ女性クリニック）

教育講演

座長 奈良県立医科大学 西川 武

「乳腺穿刺吸引細胞診における直接塗抹法とLiquid-based cytology法の細胞の見方と捉え方－相違点ならびに問題点について－」

神戸常盤大学 保健科学部 医療検査学科 畠 榮(CT, CFIAC, PhD.)

(※学術集会当時のご所属：川崎医科大学総合医療センター 病理部)

I. 諸 語

乳腺疾患では良悪性の診断に苦慮する症例も多く、正確な診断を行うためには、適正標本の作製が重要である。

今回は直接塗抹法（従来法）とLiquid-based

cytology法（LBC法）を用いた標本作製の違いによる背景所見や出現細胞の形態的特徴、相違点や問題点について述べる。LBC標本は日本ベクトン・デッキンソン社の非婦人科検体処理法に基づき作製した（図1）^{1,2)}。

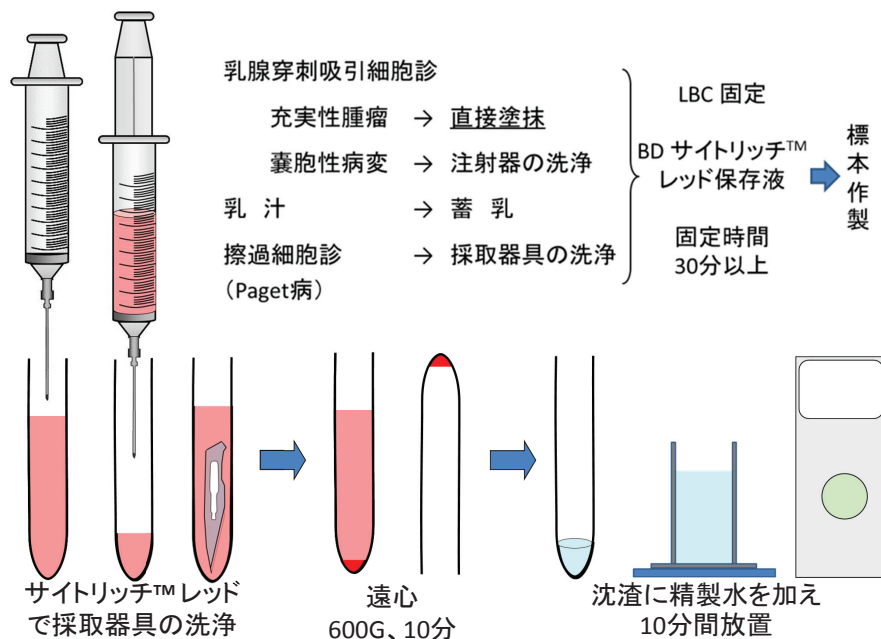


図1 SurePath法による標本作製法

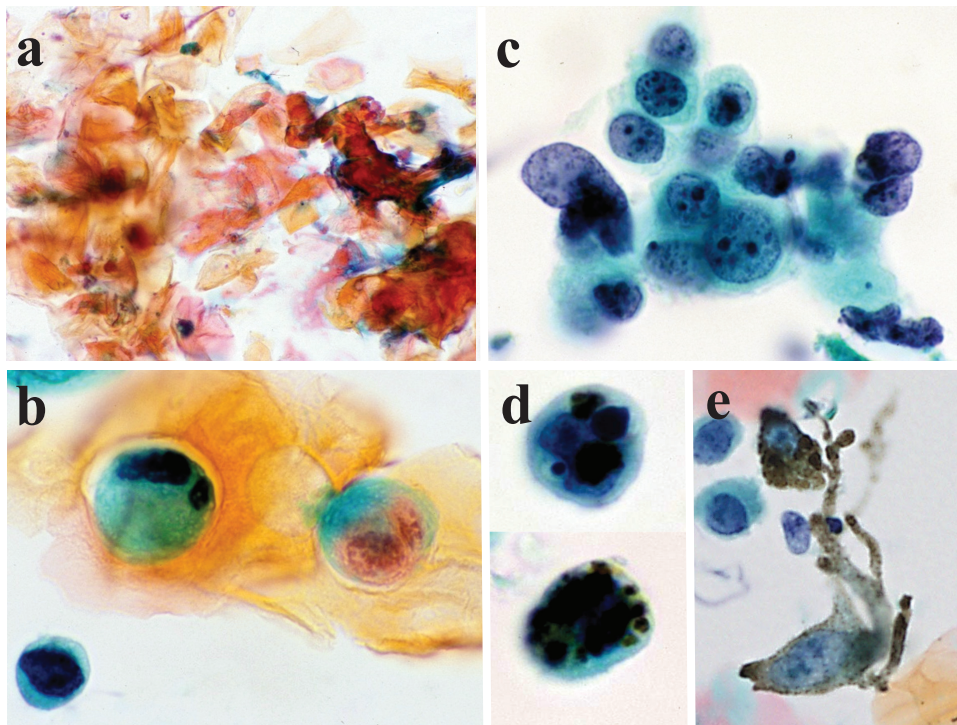


図2 Paget癌の従来法とLBC法の細胞像の違い
a,b; 従来法 多くの細胞は乾燥変性し詳細な観察が困難となる。c~d; LBC法 細胞の変性が少なく良好な細胞が得られる。メラニン顆粒を有するPaget細胞。腫瘍細胞にメラニン顆粒を移入するメラニン細胞を認める。(a; Pap染色. ×10, b; Pap染色. ×100, c~e; Pap染色×100)

II. LBC法の利点と欠点

従来法は細胞が十分に採取されていても、注射器などの採取器具に細胞が残存し、採取されたすべての細胞がスライドに塗抹されるわけではなく、診断に重要な細胞が破棄されている。これに対してLBC法の利点としては、1)採取器具である注射器を細胞保存液で洗浄することで、細胞の回収率が高まる。2)LBC法専用のプレコートスライドは、スライド表面がプラス荷電にコーティングされているため診断に必要な大型細胞集塊や血管結合織、石灰化小体などの保持に優れている。3)細胞採取時に混入する血液成分が細胞と重なることが少なく、細胞の観察が容易になる。4)採取した細胞は保存液で残せるため、再検索や免疫染色など追加標本の作製が容易である。5)塗抹範囲が限られるため鏡検時間の短縮が図れる。6)Paget病などの

直接塗抹標本では、細胞が乾燥変性するため詳細な観察が困難であるが、LBC法では、採取した器具を直接細胞保存液で洗浄し細胞を収集することで乾燥の無い良好な標本が作製できる(図2)。7)LBC法でもう一つの優れている点は、採取した細胞を圧挫しないため三次元構造が保たれ、組織構築を反映した細胞集塊を得る。などが挙げられる。

欠点としては、LBC法では細胞を一度固定するためギムザ染色やDiff-Quik[®](DQ)染色を行うことが出来ない。そのため細胞外マトリックスを多く産生する線維腺腫や基質産生癌の間質粘液、基底膜様物質を産生する腺様嚢胞癌、乳頭腫や乳腺症で認められるcollagenous spherulosisと呼ばれる無構造の球状物質の観察が困難となる³⁾。また、LBC法ではアポクリン化生のような細胞質はより

厚く、悪性リンパ腫や髄様癌のような繊細な細胞質は不明瞭となる傾向がある。

Ⅲ. 背 景

LBC法では、赤血球が細胞保存液により排除されるため乳管内に由来する泡沫細胞やヘモジデリン貧食組織球がより明瞭に観察される。アポクリン囊胞などの囊胞性病変では、輪状結晶様構造を呈したLiesegang ringsが空に浮かんだ風船の様に観察される⁴⁾。また、乳癌術後の漿液腫またはseromaより採取された検体中には、しばしばパニコロウ染色で赤色に染色されるmysospherulosisがみられる⁵⁾。問題点としては、線維腺腫でみられる間質性粘液、粘液瘤様腫瘍で認められる粘液や乳頭腺管癌の面癌腫でみられる壊死物質の減少傾向が認められる。なお、LBC法の欠点として多くの壊死物質を伴う場合には、壊死物質が標本の全面を覆い、癌細胞の付着を妨げることがあるので、注意を要する。

Ⅳ. 上皮細胞の出現パターン

1. シート状集塊

腺上皮細胞はシート状に配列し、頂部と基底部からなる頂底極性を保っている。この頂底極性に直交し、同一シート内で隣接する細胞によって示される極性を平面内細胞極性(planar cell polarity)と呼ぶ。このようなシート状集塊は、腺管を形成する腺上皮細胞に由来するものと、間質結合組織を伴い乳頭状に増殖する腺上皮細胞に由来するものの2種類に大別される。腺管形成や乳頭状増殖を特徴とする乳頭腺管癌や平坦型の非浸潤性乳管癌(ductal carcinoma in situ: DCIS)でのシート状集塊には筋上皮細胞を認めないが、良性乳腺病変の線維腺腫や良性葉状腫瘍では、筋上皮細胞が観察できる⁴⁾。

2. 腺房集塊ならびに管状集塊

従来法では標本作製時に圧挫等による人為的な力を加えるため、組織構築が破壊され完全な腺房や管状構造を呈する集塊は少ない。それに対して、LBC法では、周囲にライトグリーンに好染した基

底膜を有する三次元的なブドウの房状の集塊として観察される。顕微鏡の焦点を上げ下げすることで、honey-comb構造、腺管構造が確認できる。萎縮性乳腺では、腺房構造が萎縮し、脂肪組織の中に埋没した末梢腺管構造として観察される。

3. くさび状集塊・索状・リボン状配列

くさび状集塊は、細い管状構造に由来するもので、集塊の先端が鋭角状となっている。くさび状集塊、索状やリボン状配列は、合わせ法で作製された標本では、ほとんど認めることがない。しかし、LBC法で作製した硬癌や浸潤性小葉癌には、くさび状集塊や1層～数層の細胞がコード状に配列する索状・リボン状配列が明瞭に観察される(図3a)。このような集塊は硬化性腺腫や線維腺腫などの良性病変でくさび状集塊を認めることがあるが、これらの集塊の辺縁には筋上皮細胞を認める(図3b)。

4. 散在性・裸核状細胞

LBC法で作製された標本では、背景により多くの散在性の細胞が観察される。これらは、標本作製する手順で遠心した沈渣を攪拌するなどの人工的なアーチファクトによるものと推測される。従来法で作製した線維腺腫では多くの双極裸核細胞が特徴的所見とされているが、LBC法ではリンパ球や癌関連線維芽細胞との鑑別が困難となる傾向がある。

5. 篩状集塊

篩状腺管構造は、輪郭円滑な比較的大型の腺管内に、上皮細胞が間質の介在を伴わず架橋状に増殖、腺管内腺管形成像を呈する組織像と定義され、良性・悪性種々の病変にみられるが、腺癌の形態学的指標として重要である。

LBC法では、上皮過形成の篩状構造は、二次元的空間が相互に連絡し三次元的空間を形成し、不規則な篩状の構造を示す。それに対して、DCISの篩状構造は、規則正しい正円形の腔管として観察される(図4)。各空間は孤立し、相互の連絡はないため、顕微鏡のピントを上下することにより、球体の割面を内側からみているような三次元的な観察が可能となり、独立した空間として観察

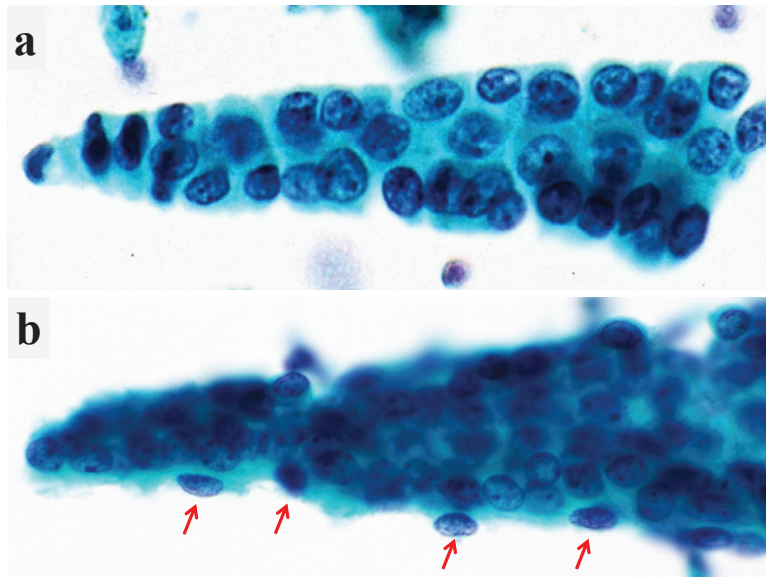


図3 硬化性腺症(a)と硬癌(b)で観察得られたくさび状細胞集塊(LBC法)
くさび状集塊は、細い管状構造に由来するもので、集塊の先端が鋭角状となっている。
良悪性の鑑別には筋上皮細胞の有無が大切な所見となる。(a:硬化性腺症, b:硬癌, Pap
染色×40)

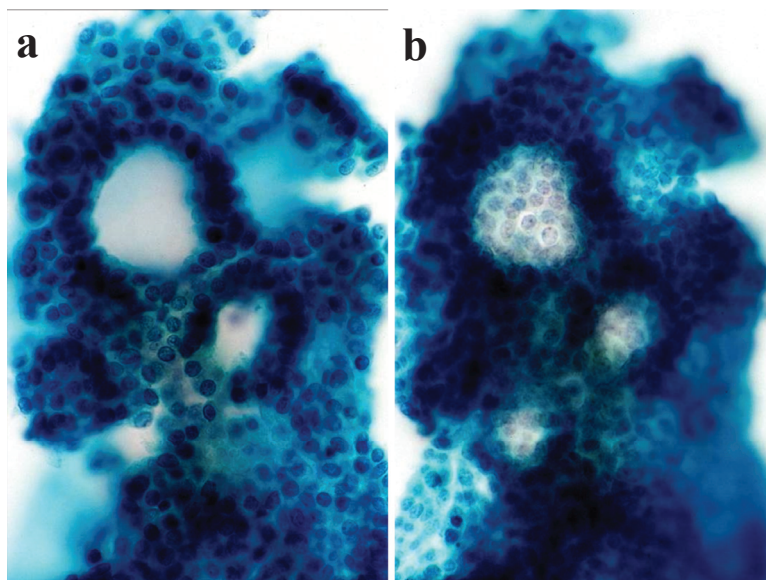


図4 LBC法にて得られた篩状細胞集塊
DCISの篩状構造は各空間が孤立し、相互の連絡はないため、顕微鏡のピント
を上下することにより、球体の割面を内側からみているような三次元的な観
察が可能となり、独立した空間として認められる。また、個々の管腔面に対
して、規則正しい正円形の腔管として観察される。(a,b Pap染色×10)

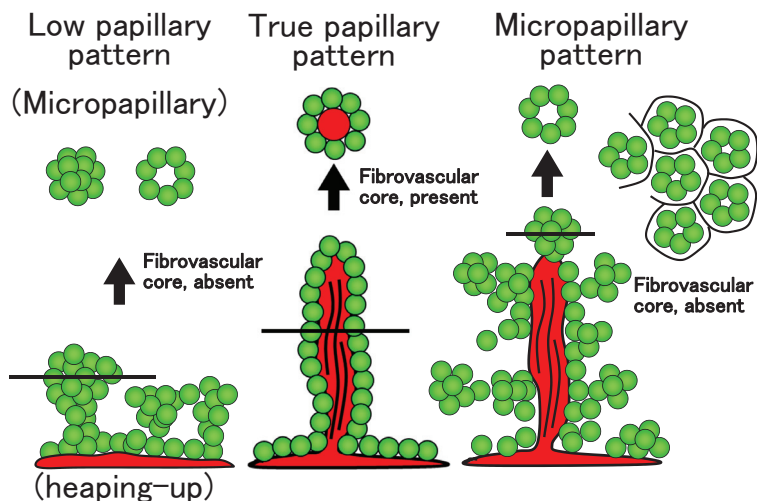


図5 乳腺病変で認められる乳頭状構造の模式図

乳頭状様増殖形態を示す細胞集塊には、左：低乳頭状構造、中：血管結合組織を芯とした真の乳頭状集塊、右：通常の腺上皮細胞でみられる腺腔面が蜂巢の最外層に存在し、血管茎を伴わない微小乳頭状がある。

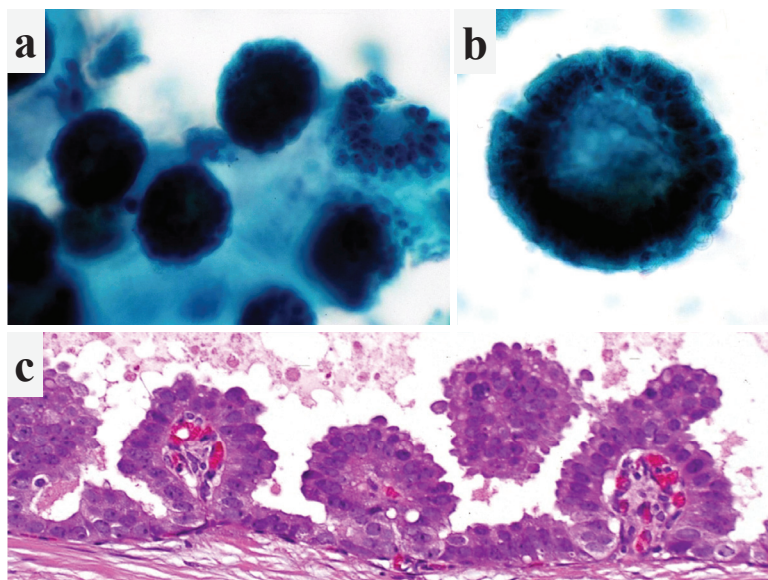


図6 LBC法にて得られたDCIS低乳頭型細胞集塊

低乳頭型のDCISでは、縦並びのまリモ状集塊や、クレーター様集塊が観察される。(a: Pap染色×10、b: Pap染色×20、c: HE染色×20)

できる^{3,4)}。

6. 乳頭状様集塊 (papillary-like conglomerate)

乳頭状様増殖形態を示す細胞集塊には、a) 血管結合組織を芯とした真の乳頭状集塊、b) DCIS 低乳頭型の細胞像、c) 通常の腺上皮細胞でみられる腺腔面が蜂巣の最外層に存在し、血管茎を伴わない微小乳頭状、などに分類できる (図5)⁶⁾。

a) 乳頭状集塊

乳頭状構築とは、芯にあたる線維血管間質の軸を上皮細胞が覆い、指状の形状を示す細胞集塊をいう。これら血管結合組織を茎とする真の乳頭状細胞集塊は、乳頭癌、乳頭腺管癌および乳管内乳頭腫で出現する。乳頭状パターンを呈する良悪性の鑑別には、きわめて難しいものが含まれる。一般的に結合組織の間質が多く、血管茎が太い乳頭状パターンは乳頭腫、上皮細胞が筋上皮細胞を介さず間質の血管結合組織にくぎ打ち状の乳頭状パターンは、乳頭癌という傾向があるが、そうでないものも認められる。筋上皮細胞の有無に言及するが、重要であるが確定的ではない。

乳管内乳頭腫では、乳管小皮細胞、筋上皮細胞とともにCK5ならびにCK14陽性のprogenitor cell、intermediary myoepithelial cell、Intermediary glandular cellの性質を有する細胞から構成される良性腫瘍がある。印環細胞様の空胞を有する細胞は、後者の性質を有する細胞で、乳頭腫の診断の助けとなる。

b) 低乳頭状集塊

低乳頭状の細胞像は、大型シート状集塊から乳頭状に突出する形態としてみられ、突出した乳頭状部分の核と基底部分のシート状の核は同様の緊満感を有している。LBCでは、組織構築が保たれているため、乳頭状増殖部に腔がみられることや、それらが遊離し縦並びのマリモ状集塊としても観察され診断の一助となる (図6)。

c) 微小乳頭状構築

乳頭状という用語が血管茎を伴う乳頭状構造を表現するのに対して、微小乳頭状とは、細胞集塊の表面にすなわち通常の腺上皮細胞でみられる腺腔面が蜂巣の最外層に存在し、“inside out”

patternあるいは“reversed polarity”などと表現される血管茎を伴わない乳頭状構造を表現する。細胞集塊の外側の細胞膜に一致して、EMA (epithelial membrane antigen) や MUC1 (mucin1) に強く染色される。

7. 血管結合組織

LBC法で乳頭状増殖を呈する腫瘍から得られた裸血管は、分枝した血管の先端がループを形成する。血管結合組織の形態像を的確に理解することは、LBC標本を診断する上で非常に重要となる。

良・悪性の鑑別には、血管結合組織と乳管上皮細胞との間に筋上皮細胞が観察されるか否か⁷⁾が重要で、乳管内乳頭腫では筋上皮細胞が残っているために鋸歯状あるいは毛羽立って見える。一方、乳頭癌では、血管結合組織と乳管上皮細胞との間に筋上皮細胞が観察されないか、少数であるため、血管の周囲が平滑な裸血管が認められる (図7)^{6,7)}。また、腫瘍の血管新生は不規則に分岐、突出した裸血管として認められる。

乳頭状増殖の芯をなす血管は、LBC標本ではUターン型の裸血管として観察される。Uターン型の血管とは、乳頭状構造の軸をなす血管で、分岐した血管の先端部がアルファベットのUに類似した形態を示す。Uターン型血管は、流入血管が進路を180度変えて、進行方向とは正反対に進む構造を呈した血管を示す用語である。このような血管は、solid papillary carcinomaで多くみられ、診断の“カギ”になる^{2,6)}。

一方、硬癌では、膠原繊維の増加や硝子化した間質が物理的な血管新生阻止因子となり、裸血管を認めることは非常に少ないが、直径15 μ m直線状の裸血管を認めることがある。

8. 橋渡し構造

橋渡し構造 (roman Britainは、組織学的には内腔を有するドーム状構造として認められる。細胞診では、長崎の石橋で認められるように、上向きに弓なりの形をしているアーチ状の細胞集塊として観察される。このような特徴的な細胞集塊を確認することにより、DCIS低乳頭型の推定診断は可能であると考えられる⁶⁾。

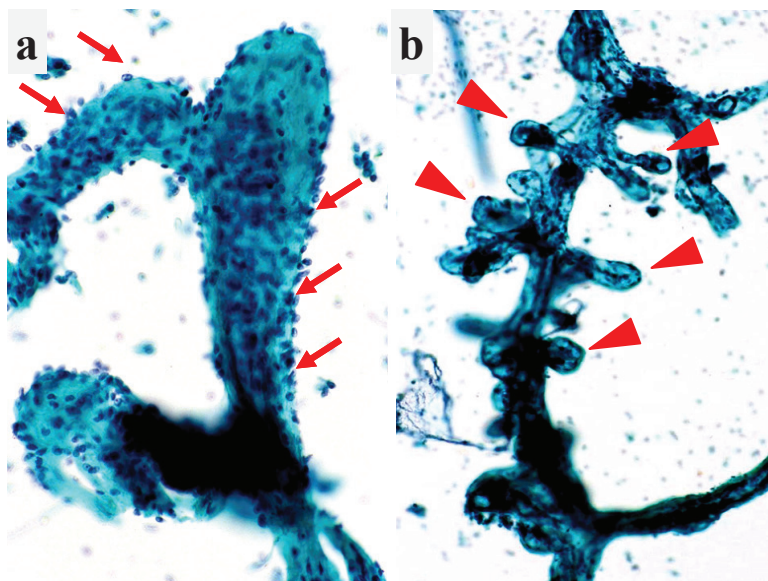


図7 LBC法にて得られた乳頭状裸血管 (a:乳頭腫、b:乳頭癌)
良・悪性の鑑別には血管結合組織と乳管上皮細胞との間に筋上皮細胞が観察されるかが重要で、a:乳管内乳頭腫では筋上皮細胞が残っているために鋸歯状あるいは毛羽立って見える (←)。b:乳頭癌では、通常筋上皮細胞は観察されないため周囲が平滑な裸血管が認められ、先端部は“U”字状構造を示す (◄)。(a,b: Pap染色×4)

9. 柵状配列集塊、フェンス様配列、扇状配列

柵状配列は、平面極性を保持した細胞が同一面積内の基底膜上で増殖するため、高円柱状を呈することで対応するものと考えられる。高円柱状上皮細胞が、頂部を起点として核下部が扇状に広がった細胞集塊は、乳頭癌の診断の根拠となる⁶⁾。

10. 細胞質内小腺腔

細胞質内小腺腔は、腺系の悪性細胞に多く認められ、電子顕微鏡では内腔面に微絨毛を認める。打ち抜き様の空胞で、中心部に点状の濃縮した粘液を認め、DPAS反応やアルシアン青染色を用いることにより明瞭となる。乳腺の細胞質内小腺腔は癌の診断の重要な所見ではあるが、良性の乳腺疾患にも1%以下の頻度で出現するため決して断定的な診断はせず、常に総合的な判断が必要である。

V. 間質成分

組織型推定を中心をなす細胞出現パターン、細胞量および細胞集散は、腫瘍を構成する上皮細胞と間質との量的比率、間質成分の種類および組織構築と密接に関係している。

葉状腫瘍は、細胞量が比較的多く採取され、乳管上皮細胞の乳頭状集塊と粘液腫様の間質細胞の混在がみられる。葉状腫瘍と診断する鍵は、①多くの間質細胞、②間質の線維細胞に軽度の核異型、③大型の間質細胞集塊などである。このような細胞像を認めたときには、葉状腫瘍を積極的に考える必要がある。また、浸潤性乳管癌では癌間質の主要な構成細胞である cancer-associated fibroblast(CAF) を多く認める⁶⁾。CAFは、TGFβを過剰に分泌することで、癌の増殖を促進し、接着分子、蛋白分解酵素、増殖因子、血管新生因子、ケモカインなど多くの分子が関与し、癌の進展を多面的に促進させることが実証されつつある⁶⁾。

VI. まとめ

乳腺穿刺吸引細胞診断を行ううえで重要なことは、個々の細胞異型の観察のみならず、背景や上皮細胞、および間質成分の形態を観察し、組織構築を推定して、良・悪性病変の鑑別点をふまえ推定診断をすることである。乳腺細胞診は、直接塗抹法が従来行われ、その手法に基づいた細胞形態学的な診断基準により診断が行われている。これらの基準にLBC法で作製した形態学的特徴を加味することで、双方の欠点を補い、個々の細胞所見に加え、三次元的な組織構築を理解することができ、より正確な診断が可能と考えられる。

文 献

- 1) 則松良明, 大崎博之, 畠 榮, 他: 第1部 細胞診の基本: 1. 細胞診断の基本 (3) 液状化検体細胞診標本作製法 病理と臨床【臨時創刊号】 31: 16-22, 2013.
- 2) 畠 榮, 福屋美奈子, 鹿股直樹, 他: 液状化検体細胞診 (LBC) にはどんなメリットがあるのか. 臨床検査 58: 685-692, 2014.
- 3) Hata S, Kanomata N, Kozuka Y, et al: Significance of collagenous and mucinous spherulosis in breast cytology specimens. Cytopathology 21: 157-160, 2010.
- 4) 畠 榮, 則松良明, 亀井敏明, 他: 編集. 液状化検体細胞診断マニュアル. 東京: 篠原出版新社 2016: pp5-17, pp196-232.
- 5) Hata S, Kanomata N, Kozuka Y, et al: Appearance of Myospherulosis of the Breast Diagnosed by Fine-Needle Aspirates: A Clinical, Cytological and Immunocytochemical Study of 23 Cases. Diagn. Cytopathol; 39: 177-180, 2011.
- 6) 畠 榮: 細胞診ワンポイント講座 知っていれば役立つ細胞所見. 東京: 篠原出版新社 2017: pp76, 85, 126-132, 174-175, 182-189.
- 7) 河合美穂, 石原明德, 小山英之, 他: 乳腺乳頭状腫瘍の鑑別診断に有用な「線維血管織」の検討. 日臨細胞誌 44: 201-204, 2005.