

# 再水和法を用いた迅速細胞診標本作製法の検討

伊藤 梨乃, 前島 澄子, 保谷 俊行, 佐野 真弓  
佐藤恵美子, 高橋 秀史

札幌社会保険総合病院 検査部

【目的】細胞収量が期待できる再水和法を用いた迅速PAP染色が、迅速細胞診に応用可能であるかについて検討した。【対象と方法】腹水3検体、胸水5検体、腹腔洗浄液9検体を対象とし、再水和法（検体塗抹後、乾燥、生理食塩水に浸透させた後、染色する方法）と、現行の迅速PAP法（現行法）の細胞形態、細胞数を比較検討した。【結果】再水和法の細胞形態は、現行法と比較して、細胞の膨化、クロマチンの微細化、核内構造の透明感の増加、細胞質の辺縁の不明瞭化がみられた。腹腔洗浄液9検体中3検体では、細胞の変性が強く、核内の微細な構造が判定不能であった。細胞数は、再水和法が有意に多かった。【結論】再水和法は胸水、腹水については、細胞収量の増加が期待でき、迅速細胞診に十分応用可能であると考えられたが、腹腔洗浄液については細胞変性を減少させるための、さらなる工夫が必要であると考えられた。

キーワード：再水和法、迅速 Papanicolaou 染色、迅速細胞診

## はじめに

当院では、液状検体に対するパパニコロウ染色（以下PAP染色と略す）は、オートスメアで細胞塗抹後、95%アルコールで固定を行うが、その際の細胞剥離が問題となることがあり、特に固定時間の短い迅速細胞診では、それが著しいと考えられる。1988年Chanらは、乾燥した検体を生理食塩水で再水和後、PAP染色した標本の評価の有用性を報告している<sup>1)</sup>。

今回われわれは、細胞収量が期待できる再水和法を用いた迅速PAP染色が、迅速細胞診に応用可能であるかについて検討した。

## 対象と方法

対象は、細胞診検査のために提出された液状検体計17件で、腹水3検体、胸水5検体、腹腔洗浄液9検体であった。

方法は、現行の迅速PAP法（以下、現行法と略す）では液状検体をオートスメアにて塗抹後、95%アルコールにて10分間固定後に染色を行なった。

また、再水和法では検体塗抹後ドライヤーを用い

て標本を乾燥し、生理食塩水に30秒浸透させた後、95%アルコールで1、3、5分固定後染色し細胞形態、細胞量を中心に現行法と比較した。

なお、標本塗抹はサクラ オートスメア12Dを用い、染色は自動染色機 Leica Autostainer XLを用い同一条件で染色した。

細胞数は、強拡大（400倍）で10視野をカウントし、その平均±標準偏差で表し、有意差の検定にはStudent's t testを用い、危険率5%以下を有意とした。

## 結 果

### 1. 細胞の形態の比較

現行法と再水和法の細胞の形態を比較したところ、腹水、胸水、腹腔洗浄液ともに、再水和法で細胞は膨化し、クロマチンが細くなり、核内構造は、やや透明感が増した印象があった。胞体の辺縁は、やや不明瞭になる傾向であった（図1、図2）。

腹水では3検体とも、再水和法で良悪の判定は可能であったが、胸水では5検体中1検体、腹腔洗浄液では、9検体中3検体は、細胞の変化が強く、核

内の微細構造が観察困難で、良悪の判定が不能であった(図3、図4)。

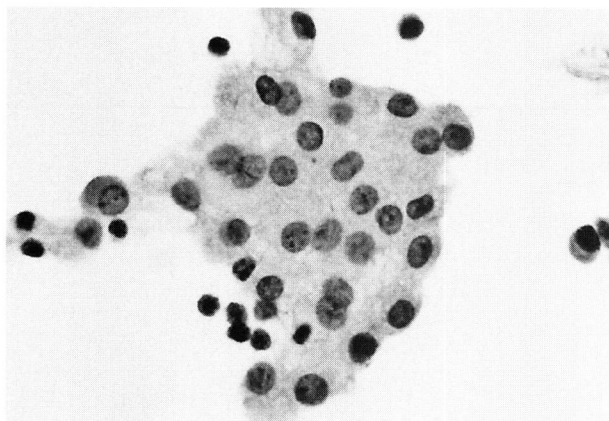


図1 現行法の細胞形態(胸水)×40

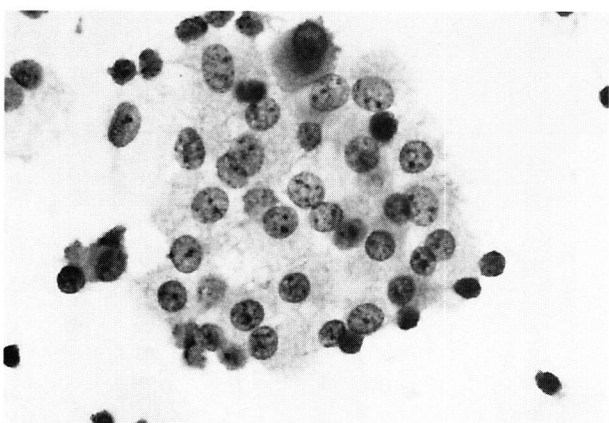


図2 再水和法の細胞形態(胸水)×40  
現行法と比較し、細胞の膨化、クロマチンの微細化、核内構造の透明感の増加、細胞質の辺縁の不明瞭化がみられた。

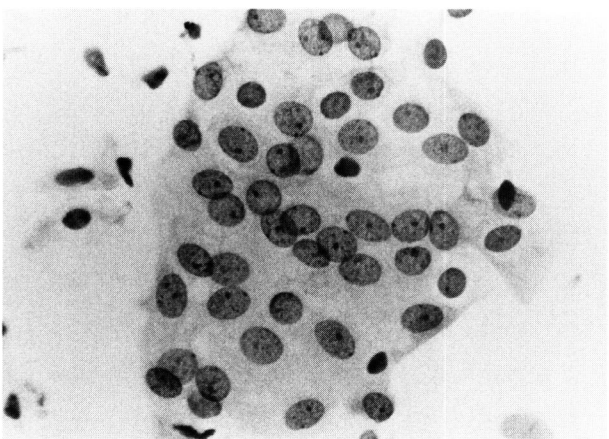


図3 現行法(腹腔洗浄液)×40

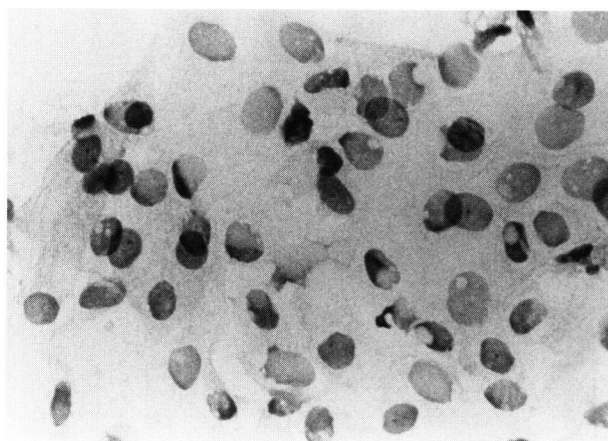


図4 再水和法(腹腔洗浄液)×40  
核内の微細構造が観察できず、良悪の判定不能であった

再水和法において、95%アルコール固定の時間を1分、3分、5分と変化させ、現行法と細胞形態を比較したが、いずれも大差はなく、核内の微細な構造が明瞭に観察され、良悪の判定も可能であった(図5、図6、図7、図8)。

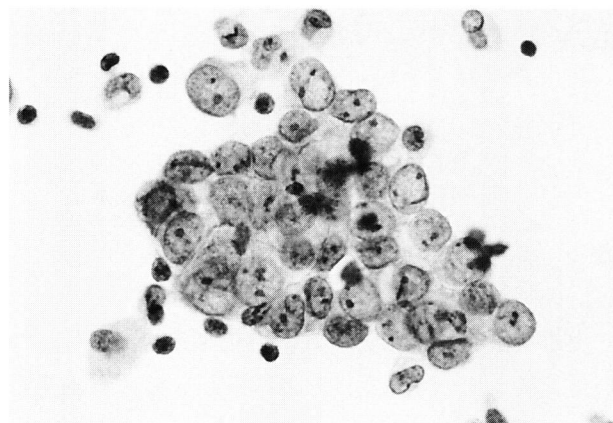


図5 現行法(腹水)×40

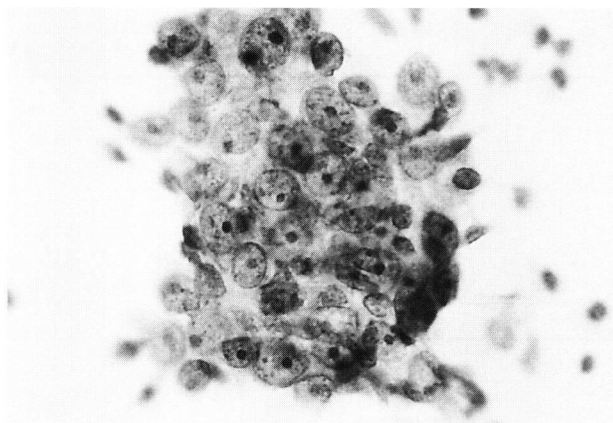


図6 再水和法1分(腹水)×40  
現行法と大差なく、核内の微細構造が明瞭に観察された。

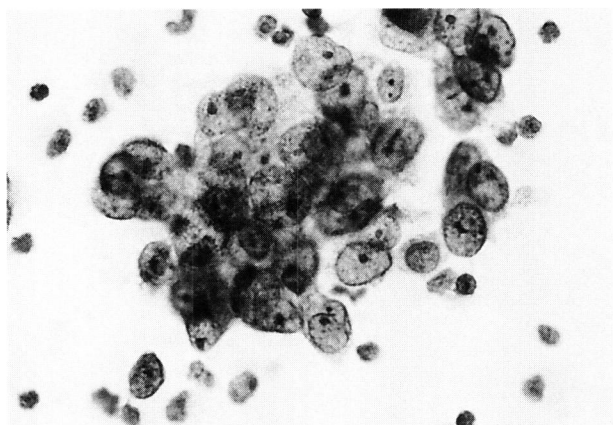


図7 再水和法3分(腹水)×40  
1分と同様、現行法と大差なかった。

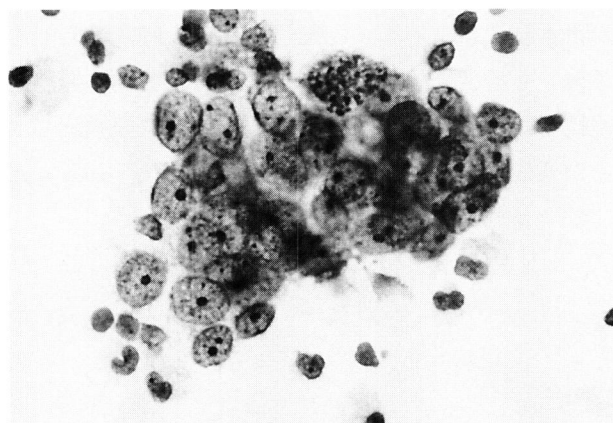


図8 再水和法5分(腹水)×40  
1分と同様、現行法と大差なかった。

## 2. 細胞数の比較

再水和法1分、3分、5分の細胞数を6検体について比較した(表1)。その結果、5検体は有意な差がみられなかった。

表1 再水和法1、3、5分の細胞数の比較  
(\* : P<0.05)

	1分	3分	5分
胸水1	47.2±9.5	46.5±7.7	49.5±5.5
胸水2*	98.7±14.8	110.9±11.8	111.8±9.6
腹水1	53.3±6.5	49.5±6.6	52.7±5.5
腹水2	19.9±5.5	21.1±4.0	23.3±8.1
腹水3	30.1±7.5	25.5±4.5	30.0±6.9
腹腔洗浄液1	50.1±19.1	44.0±8.2	44.3±6.6

以上より、再水和法におけるアルコール固定時間は1分でも十分な細胞数が得られると考え、以下の検討は、現行法と再水和法1分とを比較した。

腹水3検体、胸水4検体、腹腔洗浄液6検体計13

検体のうち10検体で、再水和法の細胞数が有意に多かった(表2)。また、陽性検体において悪性細胞集塊も再水和法でより多く認められた。

表2 現行法と再水和法の細胞数の比較  
(\* : P<0.05 \*\* : P<0.01)

	現行法	再水和法
腹水1	28.0±5.7	30.1±7.5
2*	13.2±4.2	19.9±5.5
3**	43.8±5.4	53.3±6.5
胸水1*	34.0±6.3	47.2±9.5
2*	78.5±15.1	98.7±14.8
3	51.9±11.0	60.8±5.3
4**	107.2±10.0	123.1±7.4
腹腔洗浄液1*	47.5±9.7	60.8±13.0
2**	40.0±12.3	63.8±12.6
3**	70.2±15.4	98.2±16.5
4	38.1±8.7	50.1±19.1
5**	27.7±11.0	57.1±18.3
6**	21.1±5.9	36.4±8.8

## 考 察

液状検体でのPAP染色、特に固定時間の短い迅速法では、細胞剥離が術中診断とするうえで問題となることがある。実際、本検討に先がけて現行法(迅速PAP法)と30分以上アルコール固定した通常のPAP法の細胞数を3検体について比較したが、うち2検体は迅速PAP法の細胞数が有意に少なかった。そこで細胞収量を増加し、迅速細胞診の精度の向上を目的とするために、再水和法を用いた迅速PAP染色について検討した。

再水和法は、固定前に検体を乾燥し、細胞をプレパラートに固着することにより、細胞の剥離を減少させることができると考えられる。丸田ら<sup>2)</sup>は、再水和法を用いた改良 Ultrafast PAP染色は従来のPAP法と比較して細胞量が多いと述べている。われわれの検討においても、再水和法の細胞数は現行法より有意に多いという結果であった。

再水和法の固定時間に関しては、1分、3分、5分で検討したが、いずれも細胞数に差がなく、本法の固定時間は1分で十分であると考えられた。それにより、標本作製時間は現行法の約13分から5分となり、約8分の短縮が可能となった。

細胞の形態に関して湊ら<sup>3)</sup>は、乾燥迅速PAP法は、透明感のある細胞が得られ、核内構造や核小体

が明瞭に観察され、細胞の大小不同が強調される傾向にあると報告している。また、再水和により赤血球が溶血するため、血液が多く混入している検体においては、背景が清明になると述べている。われわれの検討からも、ほぼ同様の細胞像が得られ、迅速検査として十分判定可能な細胞像であった。

しかし、腹腔洗浄液の中には判定困難例があり、特に閉腹時の洗浄液でその頻度が高かった。これらの検体では、通常PAP染色の標本でも軽度の変性が見られたことから、検体採取から処理までに時間を要したことや、手術操作そのものの影響を受けたと推定され、さらに乾燥させることにより、核内の無構造化などの変性が強調されたと考えられる。また、腹腔洗浄液は腹水、胸水に比較して蛋白濃度が低いことも原因として考えられる。洗浄液の4検体について蛋白濃度を測定してみたところ0.1~0.5%であった。亀井ら<sup>4)</sup>は、標本作製時に上清の蛋白濃度が3%程度になるように、アルブミンや血清を添加することにより、核の変性は著しく軽減されたと述べている。

判定困難例であった胸水1例についても、検体量が非常に少なく、生理食塩水を加えて標本作製を行ったため、蛋白濃度の低下により腹腔洗浄液と同様の影響を受けたと考えられた。

再水和法の染色法に関しては、今回は条件を同一にするために、自動染色機を用いた。自動染色法は、手動の染色に比較し時間を要するが、自動染色中に、同一検体のPAP染色やギムザ染色を行うことにより、PAP法との併用で診断能向上を目指した。Yangら<sup>5)</sup>は、迅速PAP法は体液の細胞診断に有用であるが、他の染色を組み合わせることが必要であると述べている。また、山岸ら<sup>6)</sup>も、PAP法のみでは偽陽性、偽陰性が生じることがあり、他の染色法と併用する必要があると述べている。

## 結 語

再水和法における固定時間は1分でも判定可能で、現行法と比較し標本作製に約8分の短縮が可能となった。細胞の形態は、腹水と胸水においては再水和法でもほぼ保たれていたが、腹腔洗浄液では、細胞の変性が強く、判定不能のことがあった。細胞数は、再水和法のほうが多い傾向が見られ、同一検体中の悪性細胞数の増加も認められた。

以上より、再水和法は、胸水、腹水については、細胞収量の増加が期待でき、迅速細胞診に十分応用可能であると考えられたが、腹腔洗浄液については、細胞変性を減少させるための、さらなる工夫が必要であると考えられた。

## 参考文献

- 1) Chan JKC, Kung IT. Rehydration of air-dried smears with normal saline: application in fine needle aspiration cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 89: 30-34, 1988.
- 2) 丸田淳子, 橋本信裕, 山下裕人他. 改良 Ultrafast Papanicolaou 染色を用いた甲状腺迅速細胞診. *J Jpn Soc Clin Cytol* 42: 212-217, 2003.
- 3) 湊宏, 堀田知子, 久富元治ほか. 乾燥迅速パパニコロウ染色の術中診断への応用. *J Jpn Soc Clin Cytol* 40: 249-256, 2001.
- 4) 亀井敏昭, 渋谷秀美. 細胞診の新しい展開—術中迅速細胞診. *病理と臨床* 20: 143-149, 2002.
- 5) Yang GCH, Papellas J, Wu HC et al. Application of Ultrafast Papanicolaou Stain to Body Fluid cytology. *Acta Cytologica* 45: 180-185, 2001.
- 6) 岸紀美江, 當銘良也, 川村公彦ほか. 胃癌術中ダグラス窩洗浄細胞診サイトスクリーニング法の検討. *J Jpn Soc Clin Cytol* 34: 562-567, 1995.

## Evaluation of Rapid Papanicolaou Stain Using Rehydration Method

Rino ITO, Sumiko MAEJIMA, Toshiyuki YASUTANI, Mayumi SANO,  
Emiko SATO, and Shuji TAKAHASHI.

Department of Clinical Laboratory, Sapporo Social Insurance General Hospital

Rapid Papanicolaou (Pap) stain using rehydration method was evaluated whether it could be applied to rapid cytologic examinations.

Seventeen liquid specimens, including three ascites, five pleural effusion and nine peritoneal lavage were entered in this study. In our conventional rapid Pap stain (routine method), wet smears were fixed in 95% ethanol for 10 minutes. In the rehydration method, smears were air-dried and the time of fixation were one, three and five minutes. The cytologic quality and the quantity of the rehydration method were compared to those of the routine method.

In the rehydration method, each cells were likely to appear larger, with clearer and more transparent nuclear features, and less clearer margin of the cytoplasm. Three of the nine peritoneal lavage specimens, subtle nuclear structures were not sufficient to diagnose.

The quantity of the cells of the rehydration method were significantly superior to that of the routine method.

In conclusion, the rehydration method could sufficiently be applied to the rapid cytologic examinations in cases the specimens were ascites or pleural effusion. In peritoneal lavage specimens, however, some technical improvement is considered to be necessary.