

第36回奈良県臨床細胞学会学術集会

日時：令和3年12月11日(土)

午後2時20分～4時30分

場所：奈良県医師会館 3F 講堂

第36回学術集会担当世話人 藤井智美（奈良県立医科大学病理診断学講座）

教育講演

座長 大和高田市立病院 病理技術科 西浦 宏和

「体腔液材料を用いたセルブロック」

公立昭和病院臨床検査科 担当科長 濱川 真治 先生

本文：

はじめに

体腔液細胞診は細胞回収から塗沫標本作製とともに、セルブロックによる免疫細胞組織化学や遺伝子解析に至るまで、各処理工程における精度向上が重要である。筆者は中皮腫細胞診断での苦い経験から、中皮腫診断に携わる諸先生方との出会い、そして体腔液に出現する細胞形態の魅力を感じながら、特にセルブロック作製技術の向上に努めてきた。本稿では体腔液細胞診におけるセルブロック作製法の取り組みと精度管理についてふれてみたい。

体腔液細胞診の実際

体腔液細胞診の主な目的は悪性細胞の鑑別である。良悪の鑑別後、組織型や原発巣推定が行われ、治療法選択にも応用される。また、予期せぬ腫瘍細胞の出現もしばしば経験され、さらに中皮腫診断においては早期診断、的確な診断による労災・救済制度申請が可能となる。そのなかで体腔液細胞診断技術の向上には、十分な検体量と効率よい有核細胞の収集、良好な塗沫標本と良質な染色、詳細な観察と鑑別、免疫細胞化学の応用には、安定したセルブロック作製法の確立と精度管理は欠かせない。

セルブロック作製法

細胞沈渣を用いるセルブロック作製には、遠沈管法やコロジオンバック法、クライオバイアル法などの直接回収法と、細胞凝固・固化法としてアルギン酸ナトリウム・塩化カルシウム法やグルコマンナン法、寒天やゼラチン、凝固因子を用いる方法などがある。いずれも細胞収集と固化させた細胞塊を処理容器から容易に取り出すことを主眼に置いた手法である(表1)。しかし固定方法や細胞固化方法の相違による細胞形態や腫瘍細胞含有率、免疫染色や遺伝子検索への影響について、臨床検体を用いた検討や報告は少なく、セルブロック作製法の大きな課題である。

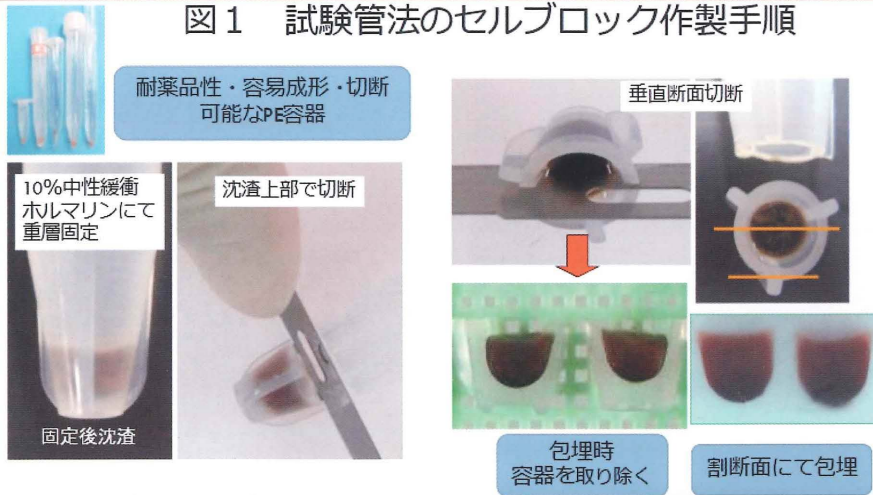
1) 当院におけるセルブロック作製法

当院では遠沈管法を改良した試験管法とサンプルチップ法を考案し導入してきた。特徴は、①容器内に細胞沈渣を遠心分離によって回収、②10%中性緩衝ホルマリンによる重層静置固定、③容器ごと細胞沈渣を垂直切断することにより切断面にて観察可能となる(図1)。試験管法は沈渣量が多い場合に用い、エッペンドルフチップ法は穿刺吸引材料など沈渣量が少量の場合に用い、沈渣量や用途に応じて2方法を使い分けている。

表1 本邦におけるセルブロック作製法

直接回収法		ゲル化法
容器内回収	直接回収	各種ゲル化剤添加
遠沈管法	剥がし法	寒天
コロジオンバック法	ナイロンメッシュ	ゼラチン
クロロホルム重層法	ティッシュペーパー	アルギン酸ナトリウム法 (原法)
クライオバイアル法	透析チューブ法	アルギン酸ナトリウム・ホルマリン法
試験管 (遠心管) 法		グルコマンナン法
サンプルチップ法		OCTコンパウンド法
綿棒チューブ法		フィブリンクロット法
パラフィン・寒天サンドイッチ法		
ピペット・オブラート法		

図1 試験管法のセルブロック作製手順



2) 試験管法の利点

まず第1に、遠心分離や10%中性緩衝ホルマリン、熱にも耐性で切断可能な各種試験管を用いることで、細胞の回収・固定・パラフィン浸透の一連の処理操作が試験管内で可能となる点である。また、遠心分離によって細胞沈渣として収集させた後、10%中性緩衝ホルマリンにて重層固定を施行することにより、組織検体に類似する細胞形態と形質の評価出来ることである。さらに体腔液細

胞材料の場合は、背景にリンパ球や組織球、反応性中皮細胞に混じて腫瘍細胞が出現し、その量や出現パターンも症例によって多彩であり、細胞沈渣層における腫瘍細胞分布は一様でない。細胞沈渣を垂直方向に2分割して割断面にて観察する試験管法は、腫瘍細胞の比重や大きさの差による沈渣層内の細胞分布が捉えやすく、例として赤血球やリンパ球、大型の腫瘍細胞は下層に、反応性中皮細胞や組織球、細胞質が空胞化した腫瘍細胞は

図2 試験管法による垂直断面観察（胸水：肺腺癌）

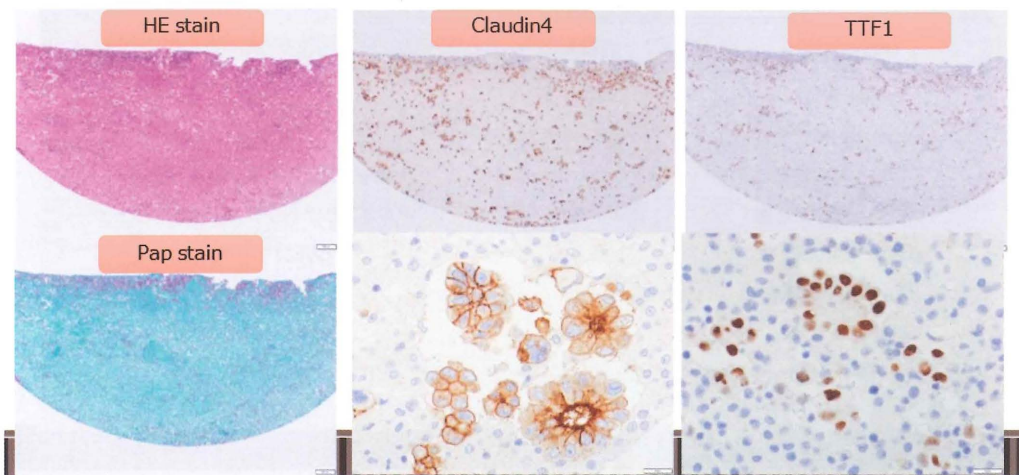
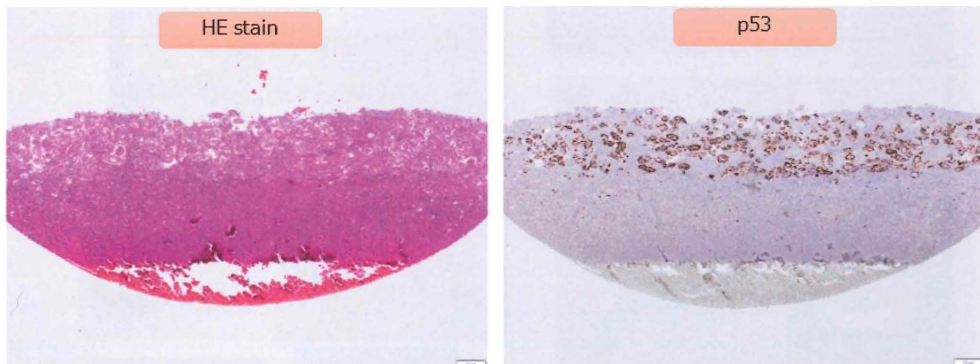


図3 試験管法による垂直断面観察（腹水：卵巣癌）



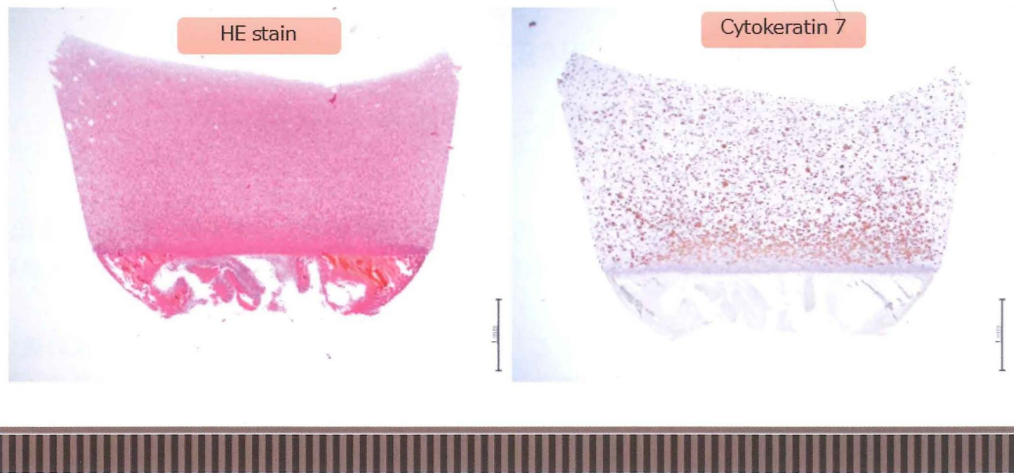
中層から表層に集まりやすい傾向がある（図2-4）。さらにゲノム解析に用いる場合、腫瘍細胞含有量評価も比較的容易であり、腫瘍含有領域をトリミング出来るなどのメリットも挙げられる。

3) 試験管法の注意点と課題

10%中性緩衝ホルマリンにて固定する際、細胞沈渣を舞い上げる（浮遊混和）固定処理は、細胞同士の結合性を低下させバラバラになりやすく、

細胞塊として回収が不良となり、アルギン酸ナトリウム・塩化カルシウム法による補助的な追加処理が必要となる。またこれらの処理は、細胞や核の収縮が著しくなり、特に中皮腫診断においては、塗沫標本による特徴的な細胞所見が観察しづらくなる傾向になる。したがって組織標本に近い細胞形態を得るためには、細胞沈渣塊を形成させた後に固定液に触れさせる重層固定が推奨される。一方で重層固定を施行する場合、沈渣量過剰状態で

図4 試験管法による垂直断面観察（胸水：肺腺癌）



は細胞沈渣塊深層部は固定不良となりやすく、細胞形態は収縮しHE染色では赤味が強くなり、安定した免疫染色結果も得られないことも多い。固定不良を回避するため細胞沈渣層厚は2~3mm程度にとどめ、それを超える沈渣量が得られた場合は、複数本に分けてセルブロックを作製することが肝要である。さらにゲノム診療への応用については、体腔液材料の保管方法、固定（保存）液の選択、固定時間、必要とする腫瘍細胞量などの検証が必須である。

まとめ

今後セルブロックの需要はますます多くなると予測される。多種多様なセルブロック作製法がある中で、その特性を熟知した上での選定導入と、さらなる技術の向上は欠かせない。本稿が参考になれば幸いである。