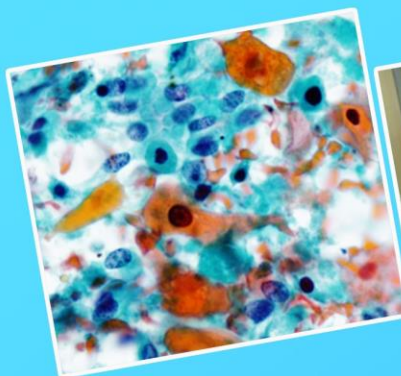
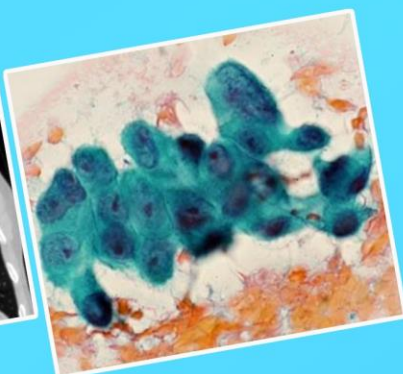
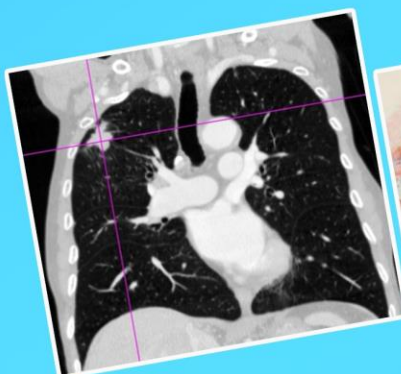


細胞診標本作製マニュアル

# 呼吸器

第2版

Methods in Pulmonary Cytology



細胞検査士会/編



# 改訂にあたって

細胞診は，肺癌診療において組織診と並び大きな役割を占めている。近年，画像診断技術の進歩によってより小さな病変の発見とアプローチが可能となった。また，治療の面においても分子生物学的解析技術の発達に伴って従来の化学治療に加え分子標的治療の導入など，その進歩はめざましいものがある。このような臨床的背景に対して細胞診に求められる診断技術（内容）もまた変化してきている。そこで現在の臨床医の要求に答えることが出来るような標本作製の技術や診断に必要な知識を加えマニュアルの改訂を行った。

# 目次

## I. 肺癌検査と診断

|                           |   |
|---------------------------|---|
| (1) 呼吸器細胞診検査の背景 .....     | 2 |
| (2) 肺癌検査と診断までの流れ .....    | 3 |
| (3) 中心型肺癌の検査の流れ .....     | 4 |
| (4) 末梢型肺癌（疑い）の検査の流れ ..... | 5 |
| (5) 画像診断技術の進歩 .....       | 6 |

## II. 細胞診検体採取と処理法

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| (1) 喀痰・蓄痰の検体処理 .....     | 8   |
| (2) 気管支鏡検査による検体採取        |     |
| A. 気管支鏡検査の概要 .....       | 1 3 |
| B. 気管支鏡検査の内容 .....       | 1 4 |
| (3) 経皮的穿刺 .....          | 1 8 |
| (4) 病巣直接採取材料の塗抹・処理 ..... | 1 9 |
| (5) 出張細胞診による迅速診断 .....   | 2 2 |
| (6) 気管支肺胞洗浄（BAL） .....   | 2 5 |

## III. 付説

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| (1) 診断への免疫染色の応用 ..... | 2 8 |
| (2) EGFR検査 .....      | 3 0 |
| (3) 呼吸器感染症 .....      | 3 2 |

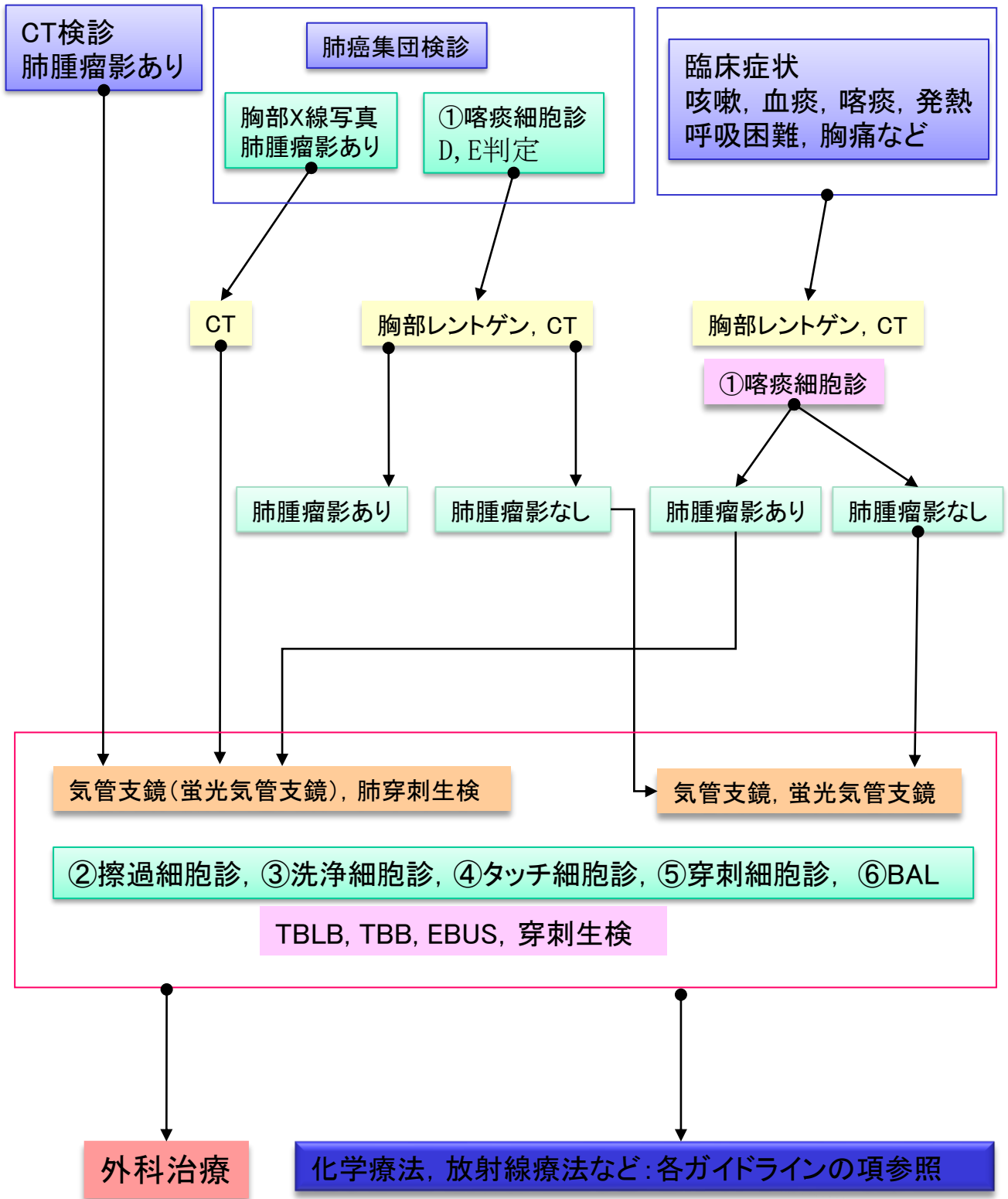
# I肺癌検査と診断

## (1) 呼吸器細胞診検査の背景

肺癌には咳・痰・血痰などの症状で発見される肺門部(中心型)肺癌と、検診や他疾患の経過観察中に無症状で発見されることが多い肺野型(末梢型)肺癌がある。レントゲンやCTなどにより発見された肺癌は気管支鏡などにより病変部からの生検や擦過細胞診を行うことで確定診断に至るが、喀痰の細胞診、あるいはリンパ節や胸水の穿刺細胞診により診断を得ることも少なくない。近年、肺癌の細胞診断は、画像診断の進歩により喀痰細胞診主体の検査から生検同様に直接採取する病変部の擦過や吸引による検査へと移行している。その検査と診断までの流れを図1～3に示す。また、治療の面では小細胞癌とそれ以外の非小細胞癌との鑑別が治療方針決定に必須であるが、化学治療の進歩と分子標的治療の導入により非小細胞癌を腺癌か扁平上皮癌に分類することが求められている。そうした鑑別診断のためには複数の抗体による免疫染色が必要であり、細胞診検体に応用可能な検体処理は、採取時の判断にゆだねられる。また分子生物学的検索にも利用可能な検体の採取も同様に材料の良否に左右される。それに伴い検査現場では目的に応じた検体処理と標本作製がこれまで以上に重要となっている。そうした臨床からの要望を背景として出張細胞診による迅速診断が普及してきた。また、細胞診は悪性診断のみならず感染症を含めた非腫瘍性病変の診断にも貢献しうるため、これらの事項を考慮した検体の取り扱いと標本作製に必要な知識や技術について記載する。

# I. 肺癌検査と診断

## (2) 肺癌検査と診断までの流れ

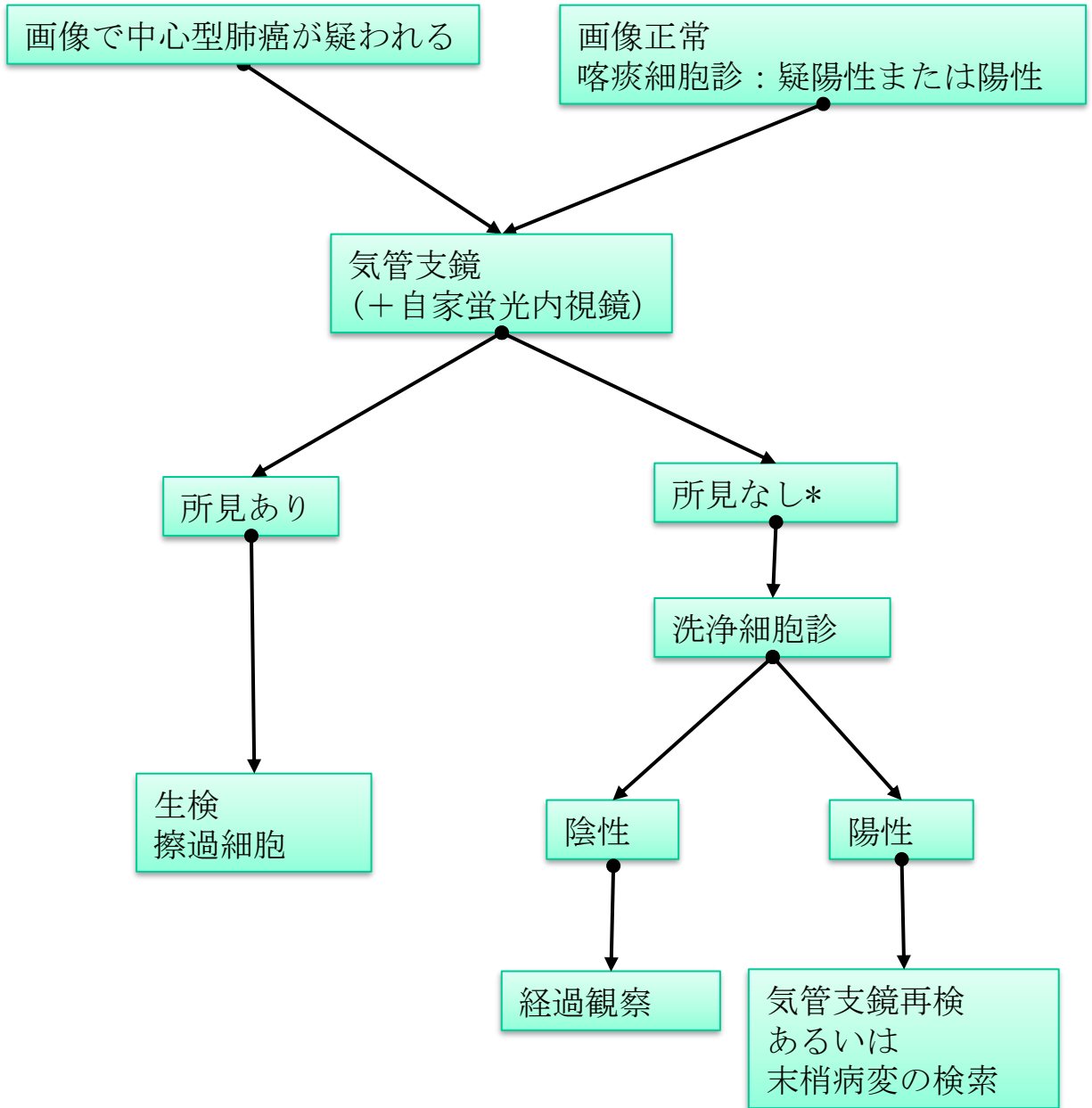


日本肺癌学会編より

図 1

# I. 肺癌検査と診断

## (3) 中心型肺癌の検査の流れ



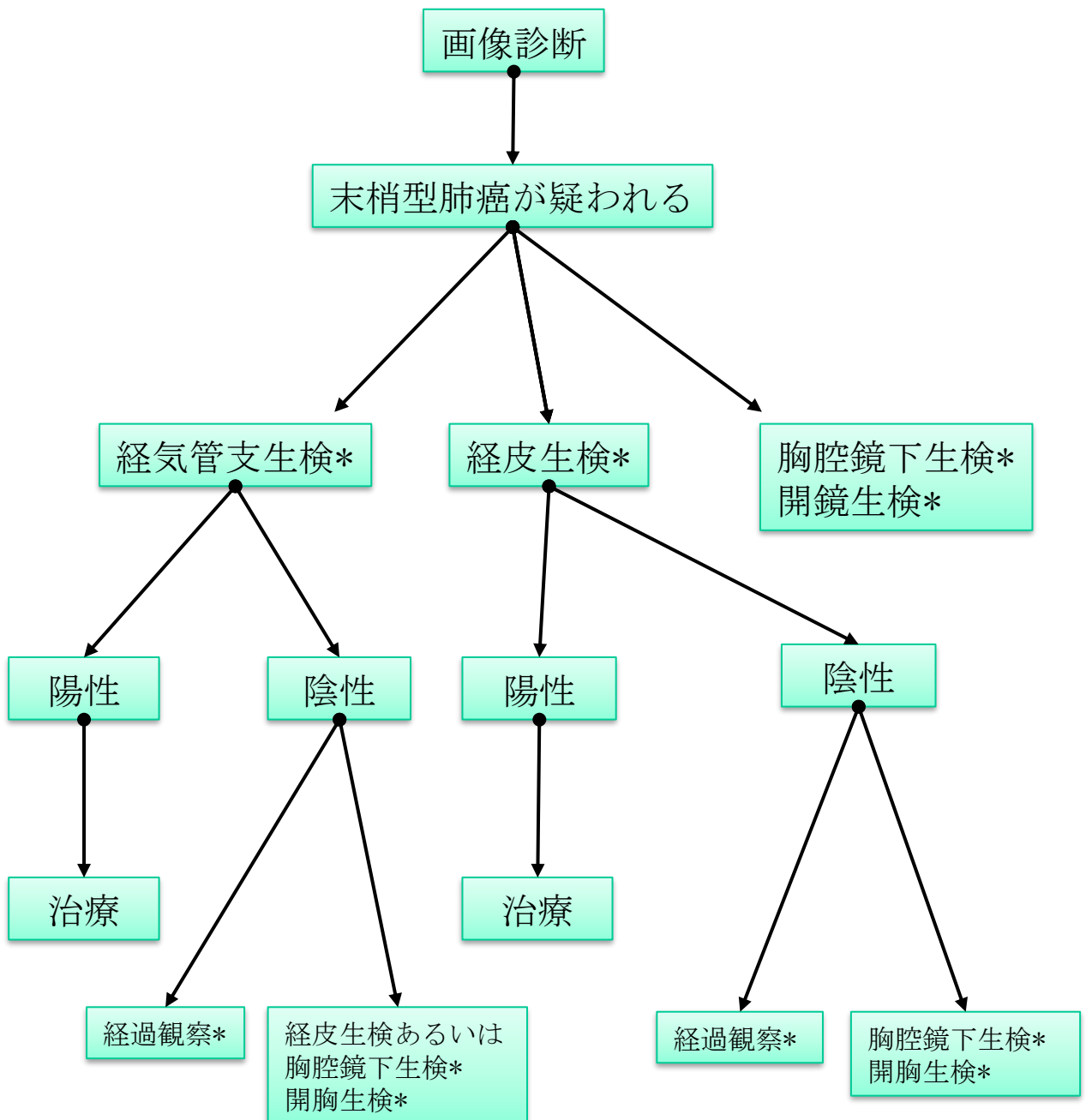
\*画像正常，喀痰細胞診陽性の場合  
は耳鼻科領域の検査

図 2

日本肺癌学会編より

# I. 肺癌検査と診断

## (4) 末梢型肺癌（疑い）の検査の流れ



\*大きさ，部位，肺癌を疑う程度より，どれを行うかを判断する。

図 3

日本肺癌学会編より

# I. 肺癌検査と診断

## (5) 画像診断技術の進歩

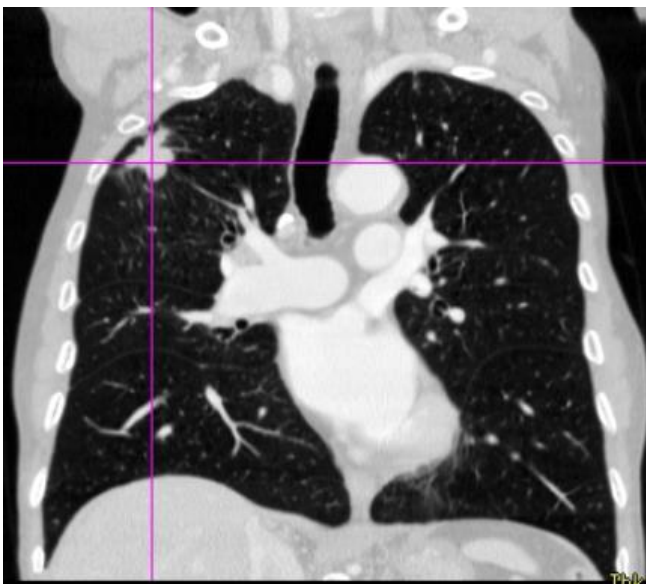
### \*撮像技術の進歩

ヘリカルCTや多列検出器CTといった撮像技術の発達により、0.5 mm厚といった非常に薄いスライスでの撮像が、日常的に可能となってきた。画像の枚数も大幅に増加したため、現在では多くの施設で、フィルムではなく、CRTや液晶モニタ上で、リアルタイムにコントラストや明るさを調節しながら画像を観察できるようになっている。十分に薄くなったスライス厚は、CT画像を3次元的に捉えることをも可能とした。1度の撮影で得られたすべての画素を、CT値（X線吸収の程度）の3次元行列として捉える。この3次元上のピクセルのことを、特に3次元であることを強調してボクセル voxel と呼ぶ（volume pixelに由来する）。任意の方向に十分な解像度を持った3次元のボクセルデータが取得できるようになり、それを記憶・処理できるメモリや処理装置も非常に安価となったため、様々なCTの観察方法が利用されている。

### MultiPlanar Reconstruction, MPR

任意断面再構成（MPR）とは3次元の等方性ボクセルデータが入手できるようになり、CTだからといって「輪切り」で体内構造を観察しないとといけない必然性がなくなったため、対象物の任意の方向の断面を再構成して表示することが可能となった（図4）。

Coronal



Sagittal

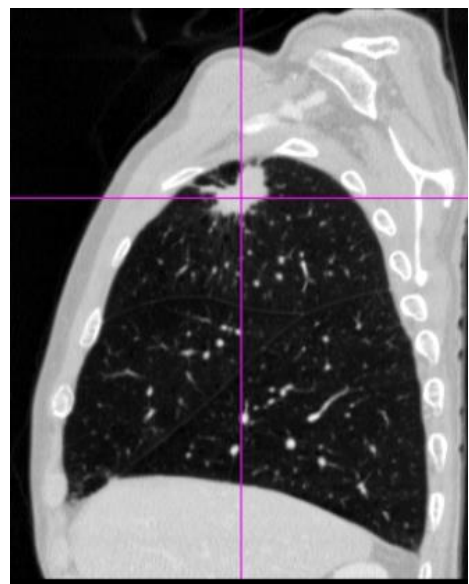


図4 MPR（dynamic CT）画像を用いた病巣関連気管支の同定



### 3次元レンダリングを用いた仮想気管支鏡

十分に解像度の高いボクセルデータは、再構成して適切な陰影付け・遠近感を施し、人間が直感的に把握できる3次元グラフィックスとして表示できる。断層像では認識しづらい複雑な脈管構造や、立体的な構造把握の難しい部位（頭蓋骨など）の診断に威力を発揮する様になった。呼吸器領域においては、病巣関連気管支の見極めを目的に仮想気管支鏡ナビゲーション（Virtual Bronchoscopic Navigation; VBN）という手法が普及しつつある。3-D volume rendering の手法により視点を気管内に置き、臓器の内面を立体的に表示する仮想気管支鏡像を作成し、術者が気管支鏡実施前に気管支鏡や鉗子の挿入ルートを確認できるバーチャル内視鏡も実用化されこれまで到達しづらかった病変へのアプローチが容易になった（図5, 6）。

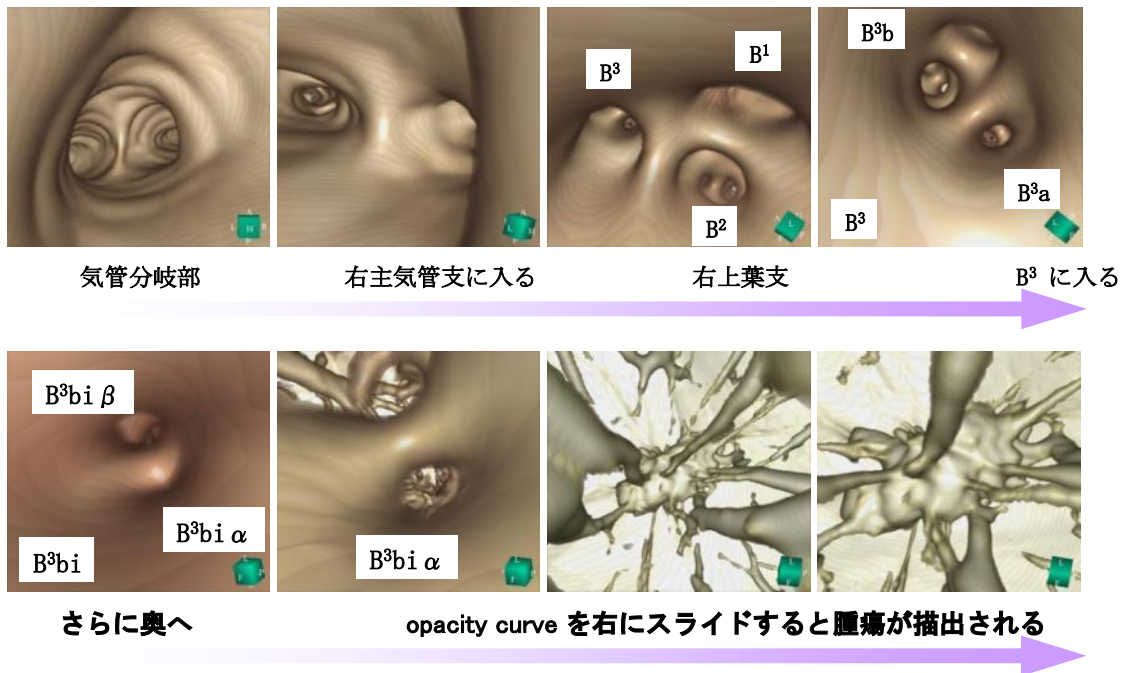


図5 仮想気管支鏡 Virtual Bronchoscopy (VBS) 画像

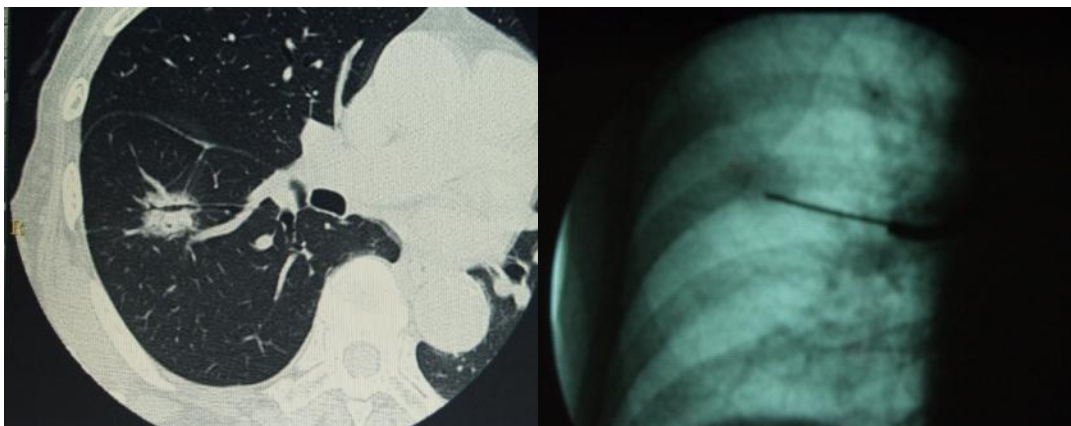


図6 気管支鏡下生検

陰影の位置、形、濃度、血管との関係などを参考に鑑別となる病変を推測する

## II. 細胞診検体処理法

### 1. 喀痰の検体処理

#### (1) 新鮮喀痰

新鮮喀痰は早朝起床時に食物残渣の混入を避けるため、口内を洗浄した後、深呼吸とともに大きな咳をさせ喀痰を喀出させる。喀痰が出ない場合には超音波ネブライザーで生理食塩水を吸入させ、喀痰を誘発させる方法が効果的である。

喀痰の陽性率は検査回数とともに向上するため、最低3日間の検査が必要である。

#### 1. 検体容器

検体は内容確認や性状観察がしやすいように、透明もしくは半透明の容器で提出してもらうことが望ましい。

#### 2. 性状観察

透明容器は濃い背景下で観察する。白色系不透明容器は、透明シャーレなどに移して濃い背景下でよく観察を行う（図7）。

#### 3. サンプルング

スライドガラスの縁、ピンセット（ルツェ型、俗称：耳鼻科用が使用しやすい）などを使って行う。採取部位は、血痰部を認める場合はその部を優先し、血痰部を認めない検体では粘液性～粘稠性部を優先し、さらに他の性状部からもサンプルングする（図8）。ピンセットは検体の数だけ用意し、使用后消毒液に浸漬する。

#### \*採取優先部位

- 1) 血痰部を認める場合はその部を最優先する。ただし、血液成分とその境界部分を採取する。
- 2) 血痰でない場合：粘液性～粘稠性部を優先し、透明無色部～透明様淡白色部（片栗粉状）、透明様黄白色部～黄白色部、黄色膿性、その他の順で採取する。



図7 喀痰は濃い色の背景下で観察する



図8 スライドガラスの縁によるサンプルング

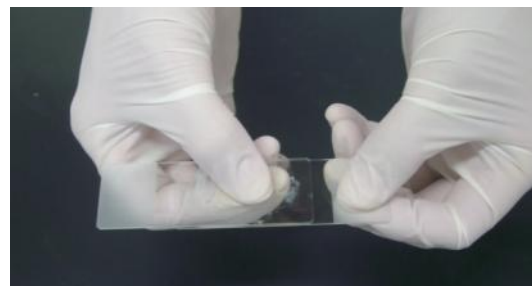


図9 もう1枚のスライドガラスで挟んで圧力をかけ、喀痰を伸展する

## 4. 塗抹, 固定

小豆～大豆大の喀痰を片方のスライドガラスに載せ, 3cm程度に細く伸ばし, もう1枚のスライドガラスで挟んで圧力をかけ, 喀痰を伸展する(図9)。量が多くはみ出たときは紙で拭き取る。前後または左右に引き離し, 2～3秒以内に固定する。すり合わせ回数が多いほど細胞破壊や核線が生じるため3回以内が望ましい(図10)。塗抹面はスライドガラス2/3以上の範囲とする。

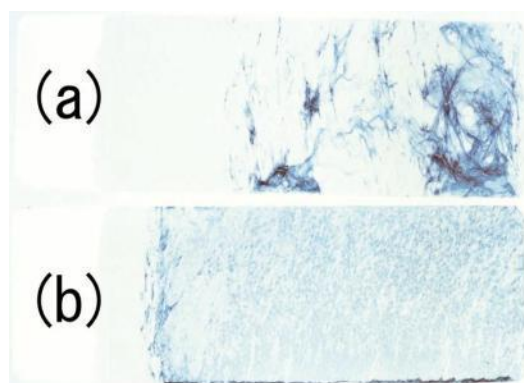


図10 (a) すり合わせ3回 (b) すり合わせ10回以上

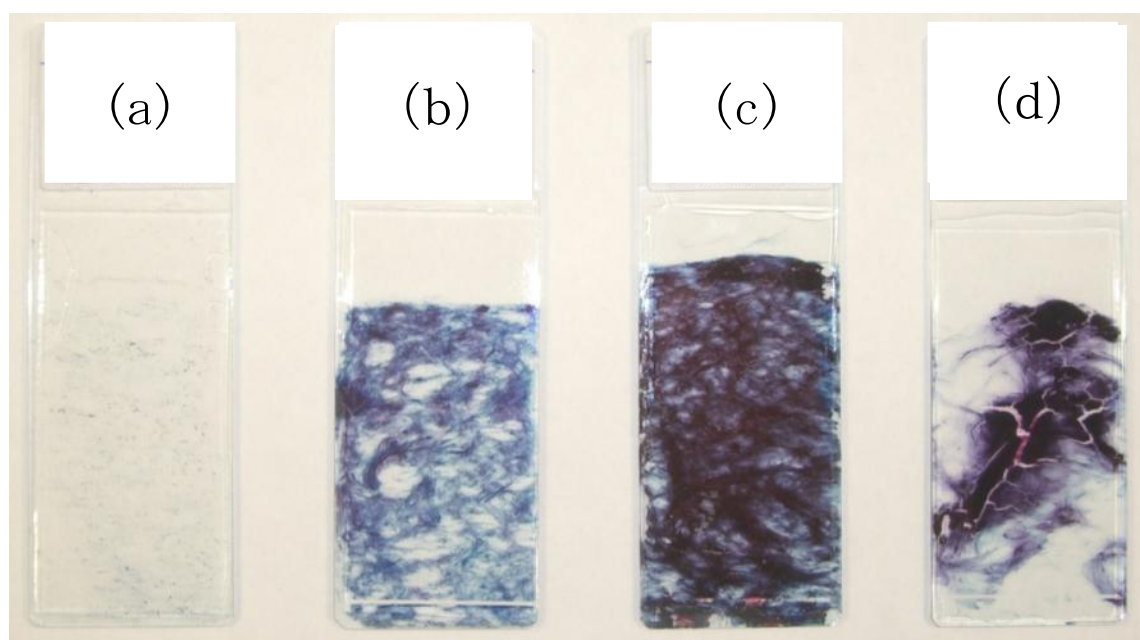


図11 検体塗抹の目安 (a)薄い (b)適正 (c)厚い (d)ムラ

## 5. 検体採取から塗抹固定までの時間

検体採取後, 2～3秒以内に塗抹固定処理することを原則とする。ただし, 検査に耐える喀痰の保存時間は室温で12時間以内, 冷蔵庫で24時間程度であり, この範囲内であれば検査は可能である。

## 6. 感染防止対策

安全キャビネット内で行うことが望ましいが, 無い場合でも結核菌対策用マスクを装着して検体を取り扱うことが望ましい。

## (2) 粘液融解法による保存痰

早朝痰を保存液中に3日分蓄痰する。採取する際に重要なことは、痰を入れる度によく振るように説明する（標本作製時に粘液が融解されている）。粘液融解の不十分な場合は融解剤を追加後、充分混和し一晩室温で放置し、完全に粘液を融解させる。

スライドガラスはコーティングガラスを使用し、塗抹面は25mm×45～50mmとする。

### 1. 塗抹, 固定

- 1) 容器のまま1,500rpm/5min遠心する。
- 2) 上清を捨て、水分を良く切る。
- 3) 沈渣液はサコマノ液(50%エタノール98mlにカーボワックス1540を2ml加えた液)を少量加えて攪拌する。希釈の割合は沈渣：サコマノ液=1：1.5～2程度が良い。亜硫酸混濁試験（ZTT）標準液の50倍濃度液の濃さを目安に沈渣液を調整する方法も良好な塗抹量が得られる（図12）。
- 4) ピペットで0.1mlをスライドガラス面に線を引くように乗せる。
- 5) もう一枚のスライドガラスを重ね、沈渣が塗抹面全体にいきわたったら、均等になるように軽く前後に動かした後、前後または左右にゆっくりと引き離す（図13）。
- 6) 一晩自然乾燥させる。
- 7) 95%アルコールで10分以上固定後、通常のパパニコロウ染色を行う。

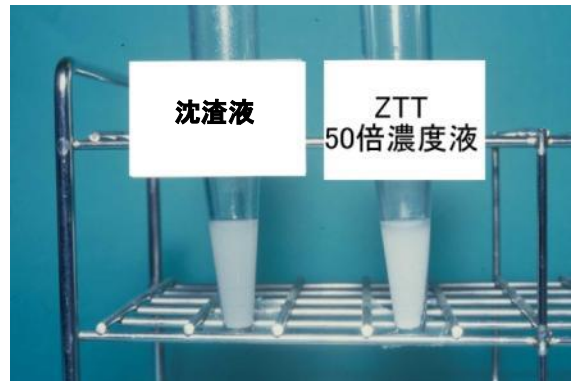


図12 沈渣液

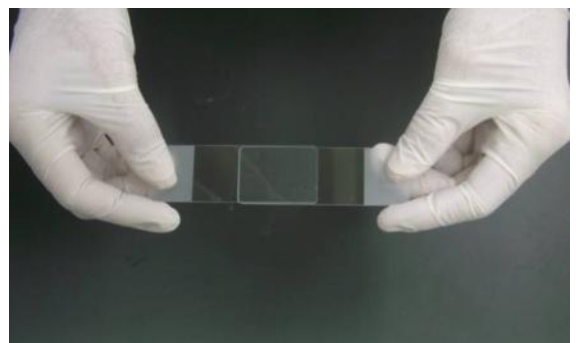


図13 沈渣液 (0.1ml)

### 2. 標本の目安

塗抹面の厚さを一定にする。【新聞紙の上においてかろうじて字が読み取れる位の厚さ（図14）400倍で1視野中の上皮細胞は90個程度が望ましい。】

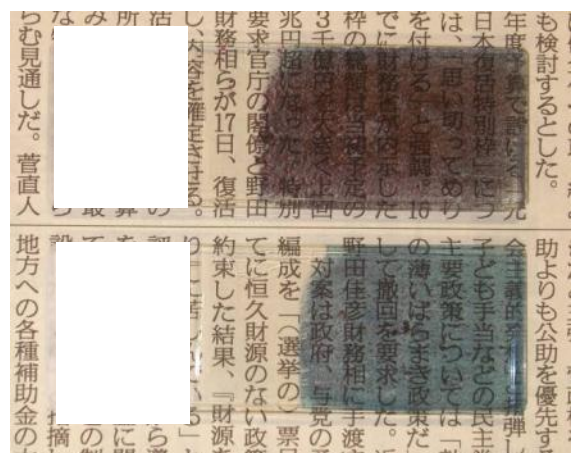


図14 すり合わせ塗抹染色後標本

### (3) ポストチューブ法による保存痰

1%チモールや50%メタノールを中心とした固定液が入ったビニール袋に約3日間の喀痰を蓄痰する。検体は容器ごと郵送することも可能であり、輸送や取り扱いは便利で、チモールの作用によりスライドガラスへの細胞の付着性はよい。しかし、メタノールが含まれているため誤飲すると危険である。

#### 1. 塗抹, 固定, 染色

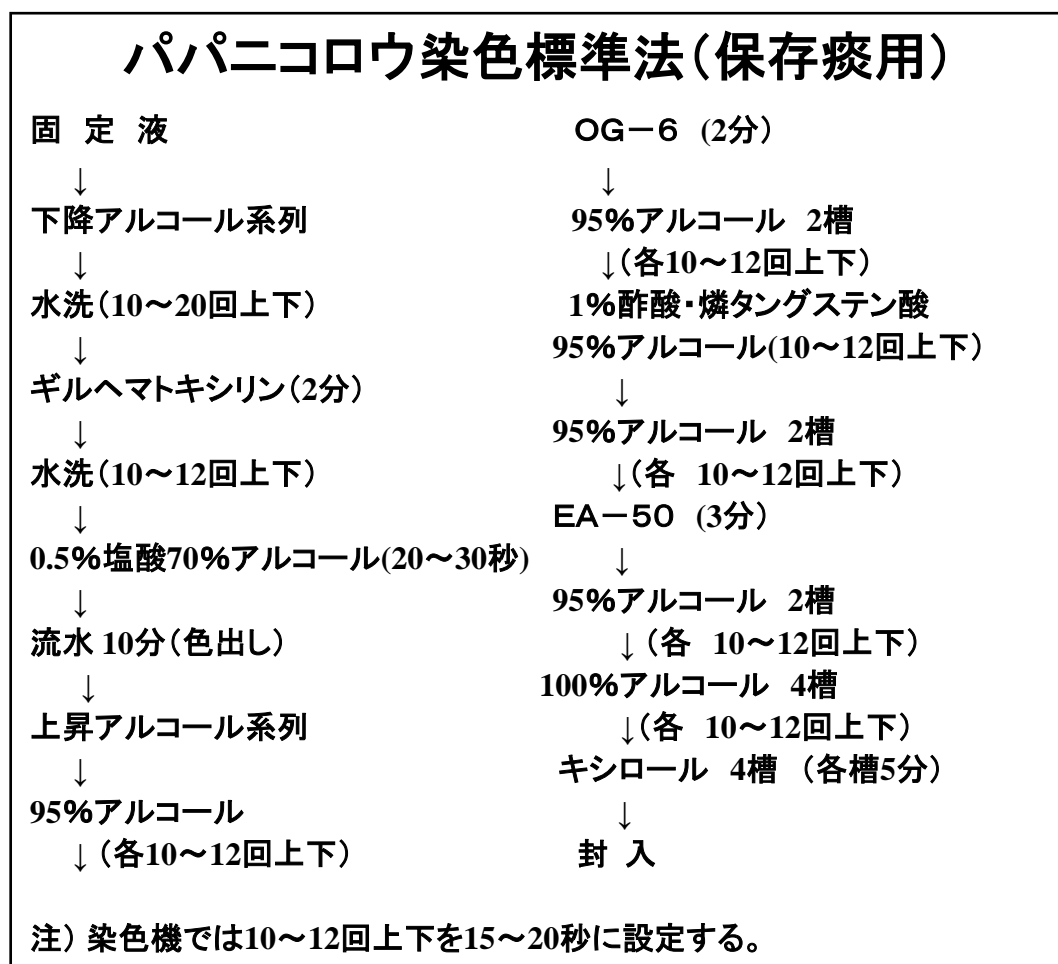
ポストチューブ付属の濾紙に喀痰をだして性状の異なる4~5ヶ所より、ピンセットを用いて豆粒より少し大きめの喀痰をスライドガラス上に採取する。その際、保存液が混入すると細胞が剥離し易くなるため十分に保存液を切る。2枚のスライドガラスで喀痰を押し広げ、均等になるように上下左右3~4回擦り合わせ塗抹する。2~3秒以内に固定液に入れると、塗抹面が剥離するため十分乾燥させた後、95%アルコールで10分以上再固定し、パパニコロウ染色を行う。

## II. 細胞診検体処理法

### 集検喀痰細胞診のための標準染色法（保存痰用）

パパニコロウ染色は細胞診の基本的な染色法であるがその染色系列や時間は施設により千差万別で検鏡者の好みや見慣れた色調を優先している。しかし、早期肺扁平上皮癌の判定には、細胞質の光輝性、濃染度が重要であるため、全国的に統一した染色法で論じられるべきであり、標本作製標準化委員会では保存痰に適した染色手技を検討し下記の結論をえた。

1. 核染の分別を1%より薄い塩酸70%アルコールでやや長めに行った方がよい。  
(0.5%塩酸70%アルコール:20~30秒または0.3%塩酸70%アルコール:40~60秒)
2. OG液とEA液の間に1% 酢酸・燐タングステン酸アルコールを使用すると、細胞質の光輝性が強まり背景もきれいになる。



#### 染色の留意事項

1. 保存痰の場合、塗抹乾燥後95%アルコール10分以上再固定が必要。
2. 塗抹から染色までの日数は2日以内がよい。
3. 染色液の交換は800~1000枚以内に行なう (500mlバット使用の場合)。
4. 染色液の交換は、古い液を半分残し半分新しい液を足す方法を頻繁に行なうことで常に一定な染め上りが保てる。
5. モレキュラーシーブ使用のキシロールで透徹を充分する。

## II. 細胞診検体処理法

### 2. 気管支鏡検査による検体採取

#### A. 気管支鏡検査の概要

気管支鏡（気管支内視鏡あるいはブロンコファイバースコープ）と呼ばれる特殊な内視鏡を鼻または口から挿入し、喉から気管支の中を観察し、細胞や組織を採取する（図15）。検査に先だって、検査に伴う咳を抑制し、喉の痛みを軽減するため、口腔の奥まで局所麻酔を行う。直径2.8～6 mmの気管支鏡を使って、細胞または組織を一部採取し、標本を製作して顕微鏡で診断を行う。

#### 気管支鏡検査の適応と禁忌

- ・肺癌やびまん性肺疾患（間質性肺炎、過敏性肺炎、サルコイドーシス、肺胞蛋白症など）、肺感染症など、ほとんどすべての呼吸器疾患の診断に気管支鏡が用いられている。
- ・著しい全身衰弱のある場合、出血傾向の著明な場合、重篤な心疾患や低肺機能のため気管支鏡検査が病状に悪影響を及ぼすことが予測される場合などは禁忌とされている。

#### 気管支鏡検査による合併症

- ・基本的には安全な検査であるが、1%前後に合併症の報告がある。検査後に喉の痛み・咳・発熱・血痰などは、多少なりとも認めることが多いが、重大なものとして、気胸・出血などが報告されている。特に気胸や出血は、生検を行うと発生のリスクが高まる。時には合併症に対する治療が必要になることもある。また、検査時に使用する麻酔（キシロカイン）などの薬剤でアレルギーや中毒の報告もある。まれではあるが死亡例の報告もある（0.01%前後）。

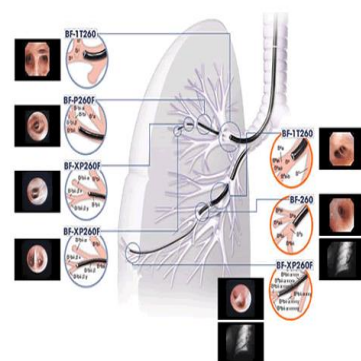


図15 Olympus EVIS LUCERA BF-260 series

## B. 気管支鏡検査の内容

### 1. 経気管支的腫瘍生検, TBB (TransBronchial Biopsy)

TBBは腫瘍を狙って行う生検手技。気管・気管支内病変のある場合には直視下生検となる。末梢型腺癌などではCT読影により同定した病巣気管支に鉗子を挿入し、X線透視下で体位変換を行って病巣にhitしていることを確認しながら生検を行う。

迅速細胞診ができなかった時代には少しでも診断率を向上させるため複数の手技を用いて材料採取を施行したり採取検体数も多かったが、迅速細胞診が可能となったからは過剰な生検や擦過細胞診を省くことにより患者さんの負担は減った。TBBの適応は、肺癌や腫瘍性が疑われる肺病変、気管支ポリープ状病変など。

### 2. 経気管支肺生検, TBLB (TransBronchial Lung Biopsy)

X線透視下で生検鉗子を挿入し胸膜直下の末梢肺から組織を摘み取ってくる手技をTBLBと呼ぶ。採取した組織は注射器で陰圧をかけて膨らましてからホルマリン固定する。TBLBは半米粒大の小組織片を取ってくるので、BALより確実な病理診断が可能となる。

TBLBが適応される主な疾患は、び慢性肺疾患、サルコイドーシス、過敏性肺炎などである。

### 3. 気管支肺胞洗浄, BAL (BronchoAlveolar Lavage)

気管支内視鏡を病巣部の近くまで挿入し、人肌に温めた生理食塩水（1回50 cc）を気管支鏡の鉗子孔から注入する。注入後、低圧で吸引し洗浄液を回収する。この操作を2～3回繰り返す。洗浄液中の細胞は一部フローサイトメトリーによりCD4, CD8陽性リンパ球の測定を行う。洗浄液中の細胞の分類を行うことにより呼吸器疾患の鑑別診断に有用な情報が得られる。

### 4. 擦過細胞診 (Brushing Cytology)

専用のブラシを用いて病変部位を擦過し擦過細胞診標本を作製する。

またキュレットは、先端が屈曲可能な耳かきのような道具で病巣を擦過し細胞診標本を作製する。

### 5. 気管支洗浄細胞診 (Washing Cytology)

BALと異なり、擦過細胞診を施行した後に診断の補助的手段として、少量の生理食塩水にて病巣を洗浄し洗浄細胞診標本を作製する。



## 6. 経気管支的吸引細胞診, TBAC (TransBronchial Aspiration Cytology)

肺内病変, 気管支内病変に乏しく, 肺門や縦隔のリンパ節の腫大のみが目立つような場合に主として気管分岐下リンパ節を狙って行われる手技をTBACという。気管支鏡で気管分岐部を直視しながら穿刺針で気管分岐部を穿刺し, 穿刺針に接続された注射器で陰圧をかけて細胞の吸引を行う。通常用いられる針の太さは21G程度なので細胞診しか得られない(図16)。

## 7. 経気管支的針吸引組織診, TBNA (TransBronchial Needle Aspiration)

TBACでは細胞診しかできないが, TBNA針(ワン針)を用いると, 組織片の採取も可能となる。慣れていないと手技がやや難しいのと後出血が比較的多い点に注意を要する(図17)。



図16 最近, 19GのSmooth Shotが発売された。

Olympus Smooth Shot



図17 専用吸引シリンジ(左)と19GのWang針(右)

## 8. 超音波気管支鏡診断 (Endobronchial Ultrasonography: EBUS)

気管支腔内超音波検査法は、気管支腔内に細径超音波プローブを挿入し、気道壁及び壁外の組織の断層像をえる検査法である。EBUSは、超音波端子装置の軽量・小型化に伴い近年普及し、呼吸器領域の多くの疾患への診断、評価に応用されるようになってきた。気道壁および気管支周囲構造を観察する方法以外にも、肺末梢病変の経気管支肺生検のガイドおよび画像診断の手段として応用され良好な成績が報告されている。超音波プローブには気道の長軸方向のスキャンを行なうconvex typeとradial scanning transducerを備えたものがある。気管支壁への腫瘍進達度とリンパ節腫大の評価にはラジアル走査式超音波プローブを使用する(図18)。このプローブを気管支内の腫瘍にあてて、腫瘍がどの程度の深さまで浸潤しているかを決めることができる。

\***ガイドシース法**：X線透視下で確認しづらい末梢の陰影に対し超音波を用い病変部位を同定し、ガイドシースを留置することにより同部位へ確実なアプローチができ確実な検体採取が可能となった(図19)。

\***EBUS-TBNA**：気管・気管支周囲病変に対するEBUS-TBNAが可能であるコンベックス走査式超音波気管支鏡(図20)の開発により、気管・気管支周囲病変に対するリアルタイムの超音波ガイド下生検が可能となった。気管或いは気管支に接している病変であれば、EBUS-TBNAは可能である。(図21) 適応疾患には肺門・縦隔リンパ節腫脹症例、肺腫瘍、縦隔腫瘍などが挙げられる。

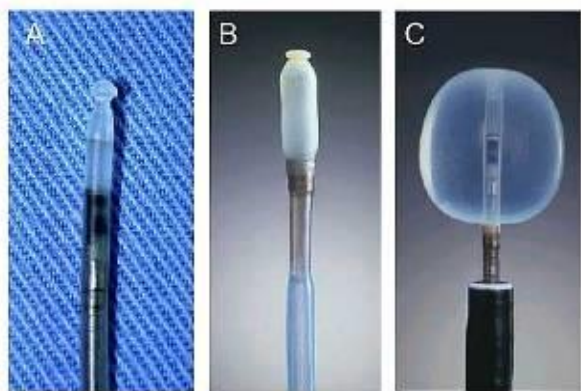


図18 気管支超音波機器

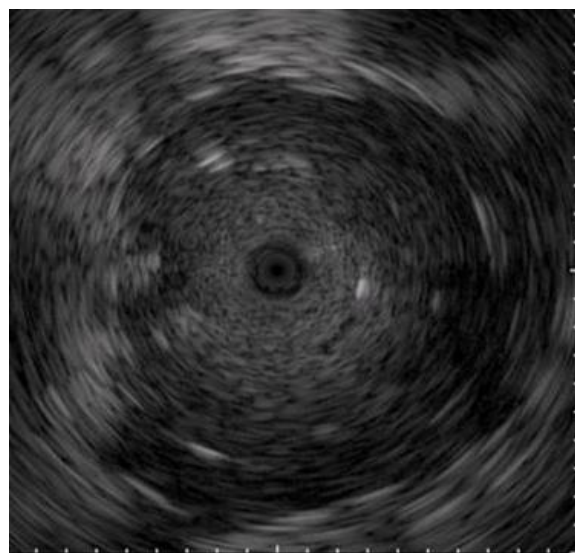


図19 末梢気管支での超音波気管支鏡の所見(ガイドシース法)

気管支の周囲に腫瘍の存在が確認出来る。

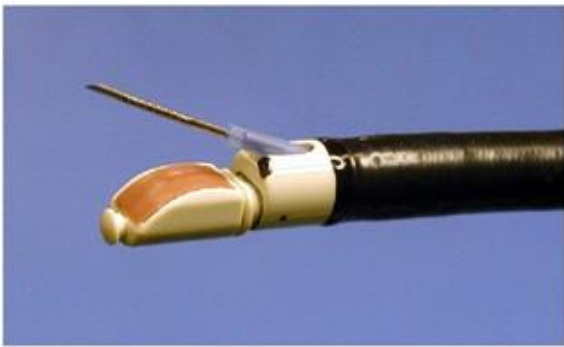


図20 コンベックス走査式超音波気管支鏡  
先端にlinear probeが装着されたビデオ気  
管支鏡でEBUS-TBNAが可能である。

No. 7リンパ節：癌浸潤で腫大したリンパ節  
の針生検時のエコー像。

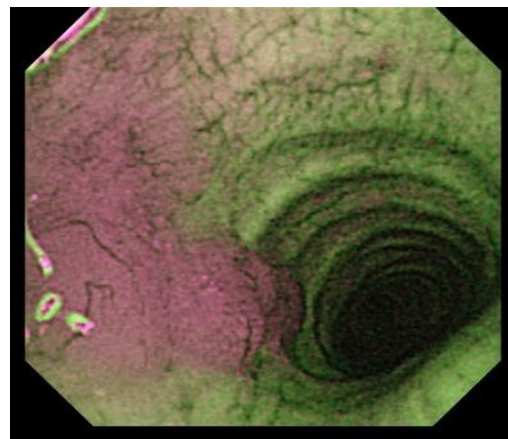
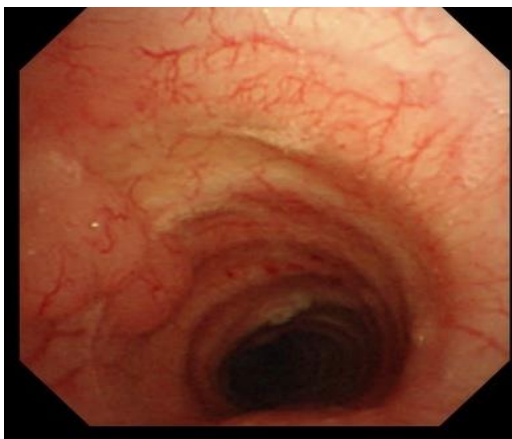
腫瘍内に穿刺した生検針をエコーで直接  
見ることが出来、部位確認が確実に可能  
である。またドプラーで領域内の血流を  
予め確認できるので、血管を穿刺するリ  
スクを減らすことが出来る。



図21 中枢気管支での超音波気管支鏡の所見  
(EBUS-TBNA)

## 9. 蛍光気管支鏡検査 (autofluorescence imaging ; AFI)

蛍光気管支鏡は、亜区域の気管支領域までの癌病変検索する際に気管・気管支粘膜の  
色調の差で従来の白色光では発見しづらい病変を同定することを可能にした。



(腫瘍部はマゼンダ色に見える。)

図22 中枢気道病変の蛍光気管支鏡

### 3. 経皮的穿刺

#### CTガイド下穿刺法

体内の組織を取り出してその性状を調べる検査（生検）は、針を刺すだけで施行できれば切開するのにならべて侵襲をはるかに少なくすることができる。

CTで位置を確認しながら穿刺部位を決定することで実現したものをCTガイド下生検と呼ぶ。肺腫瘍等の診断に用いられている（図23）。

CTガイド下生検には、組織生検と穿刺吸引細胞診がある。

#### CTガイド下生検の適応

経気管支鏡的アプローチで診断困難な場合。

大きな病変であっても、高齢などの理由で気管支鏡検査が困難な場合。

径7mm以上の結節で、穿刺ルートに太い血管等危険な構造物がないことが条件。

#### CT透視

リアルタイムで再構成されたCT画像を透視のように用いて穿刺やIVR手技を行うための装置。

CT透視を間歇的に用いることにより、リアルタイムに腫瘍と電極針の位置を把握しつつ正確な穿刺をすることができ、手技時間短縮にも寄与する。

Tru-cut型の半自動生検針であるSuper core II Needleなどの生検針を使用する。

外筒針を用いると1回の胸膜穿刺で複数回の組織採取が可能。

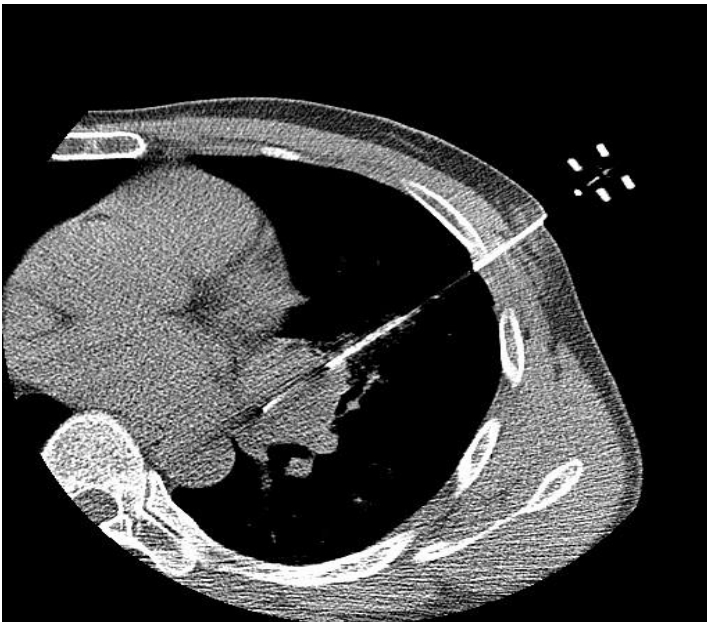


図23 CTガイド下生検時のCT像

## II. 細胞診検体処理法

### 4. 病巣直接採取材料の塗抹・処理

感染防止のためにゴム手袋，結核菌対策用マスク，ゴーグル等を着用する。

気管支鏡検査は基本的に患者の負担が大きい検査であるため，採取された検体の塗抹処理はより慎重に，かつ手早く迅速に行なうことが重要である。

#### (1) 気管支擦過細胞診

細胞採取器具にはブラシ（図24）とキュレット（鋭匙）がある。

##### 1. ブラシの場合

ファイバースコープから取り出されたブラシをすばやく付け根部分を持って塗抹する。塗抹方法として大きく3通りの方法があるが（図25～28），ブラシをスライドガラス面に強く押し付け過ぎないようにする。

①スライドガラス面にブラシを軽く押し付け引き伸ばす方法で，縦塗りでも横塗り（図25）でもかまわない。

②ブラシの先端部を持って，ムチで叩き付けるようにはじいてスライドガラスへ材料を塗抹する（図26）。

③ブラシの毛部分が硬い場合は，スライドガラス2枚ではさむように軽く押しつけて塗抹する（図27）。

また2枚のスライドでブラシをはさみ，すり合わせて双方向に引き伸ばす方法もある（図28）。

##### 2. キュレット（鋭匙）の場合

キュレットの付け根の部分を持ち，キュレットの中の材料をスライドガラス上にたたきつけるように出し（もう1枚のスライドガラスではずみをつけるとやり易い（図29），2～3秒以内に軽くすり合わせて塗抹する。

塗抹後，2～3秒以内に固定液（95%エチルアルコール）に浸す。スプレー固定またはコーティング固定でも構わない。また各種免疫細胞染色やギムザ染色標本などに対しては各々の染色法に適した固定を行う。細胞剥離やコンタミネーション，重積過剰による鏡検不能を防ぐためにも極端に厚くならないように均一に塗抹する。

従来は，Pap染色の細胞形態所見により小細胞癌と非小細胞癌に区別されていたが，化学治療の進歩に伴いより詳細な組織型の鑑別のため免疫染色が必要となった。近年，多くの施設で細胞診標本による免疫染色を施行するための工夫としてマウントクイック法やブラシ洗浄液によるシンレイヤー法が取り入れられている。

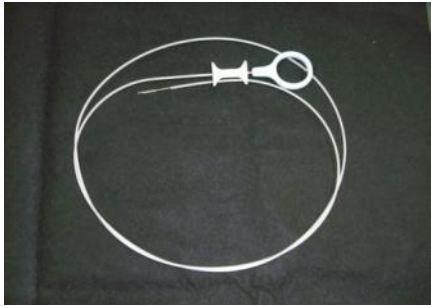


図24 気管支鏡の中に挿入するブラシ

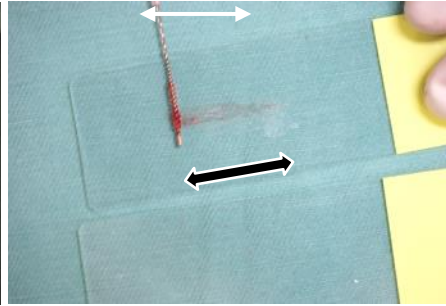


図25 矢印方向へ横に塗抹

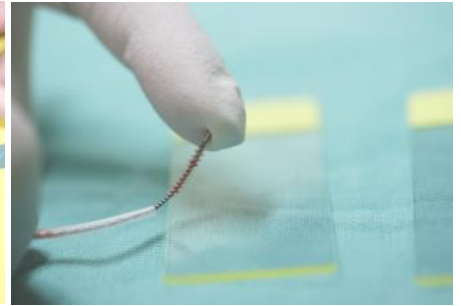


図26 ムチでたたくように塗抹



図27 スライドではさむように塗抹。

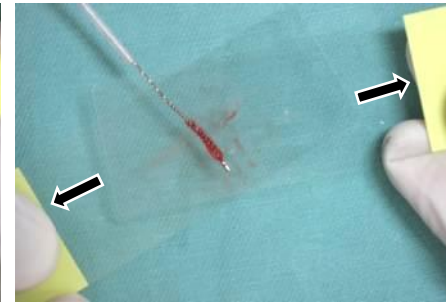


図28 ブラシを挟んですり合わせて  
双方向に引き伸ばして塗抹

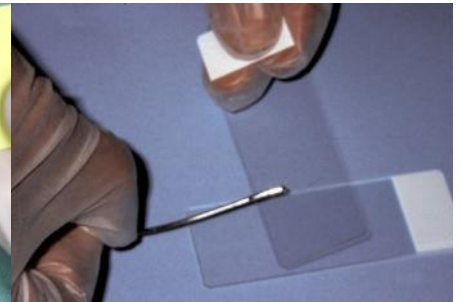


図29 キュレット（鋭匙）の  
塗抹

## (2) 擦過・穿刺器具の洗浄液

擦過および穿刺器具を洗浄する場合は、低濃度アルコールとポリエチレングルコールを含む細胞保存液で洗浄した後（5日以内）、集細胞を行い再固定を施すと良好な細胞標本が得られる。また、ギムザ染色を併用するときは、3%アルブミン添加緩衝食塩水にて洗浄すると良好な標本が得られるが、このよう場合は3時間以内に検体処理をする。なお、生理食塩水による洗浄は時間の経過とともに核が膨化、変性するため避けた方が良い（図30, 31）。

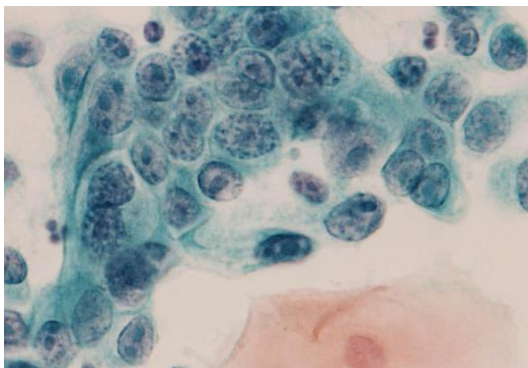


図30 生理食塩水洗浄直後塗抹固定

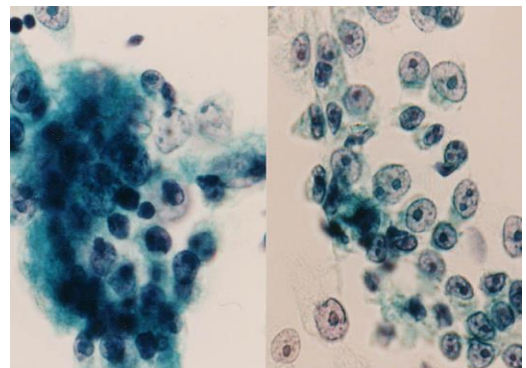


図31 生理食塩水洗浄

a: 1時間後塗抹固定 b: 3時間後塗抹固定

## 肺穿刺吸引材料の処理

X線透視下やCTガイド下あるいは気管支鏡下で、病巣から穿刺針にて吸引された材料を塗抹、固定し、染色する（図32, 33）。

### 塗抹、固定

穿刺針の内容物をスライドガラス上に静かに噴き出し、穿刺針の先で薄く延ばすように塗抹し（または、2枚のスライドガラスで軽くすり合わせ塗抹してもよい。1枚はギムザ染色用として素早く風乾してもよい）、2～3秒以内に固定液に入れる。血液成分や液状成分が採取された場合は、すり合わせ塗抹後、スプレー固定（コーティング固定）をする。スプレー固定せずにアルコール固定液に入れると細胞がスライドガラスから剥脱してしまう場合が多い。採取量が少ない場合は塗抹後、乾燥しやすいので特に注意する。内容物を噴き出した後の穿刺針は、洗浄液（サコマノ液、Hanks液やTC-109などの組織培養液）で洗い、遠心法、オートスメア法、フィルター法などで塗抹する。

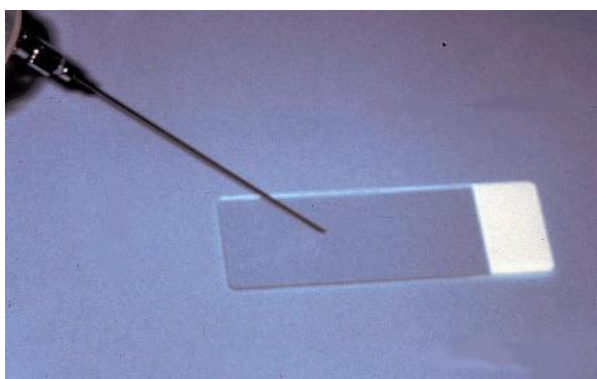


図32 肺穿刺吸引材料の塗抹

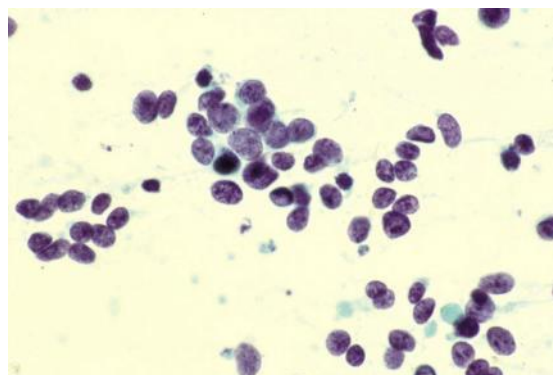


図33 肺の腫瘍穿刺で得られた小細胞癌細胞（400倍）

## II. 細胞診検体処理法

### 5. 出張（ベッドサイド）細胞診による迅速診断

#### 気管支鏡・CTガイド下穿刺における迅速細胞診の有用性

気管支鏡やCTガイド下による細胞診断は、日常の肺癌診療における重要な検査であるが、他の細胞診断と比較して患者の負担は大きく正診率も高くないのが現状である。診断精度を上げるためには、診断材料が確実に採れているかを検査現場で確認することが重要である。近年、多くの施設で細胞検査士が臨床現場へ出向き標本作製を兼ねた出張細胞診による迅速細胞診断が行われ成果を上げている（図34）。

本来、出張細胞診による迅速診断は材料採取の良否を判断することを目的としているが、以下に挙げるような効果を生んでいる。

1. 気管支鏡での診断率の向上
2. 気管支鏡術者への安心感と技術の向上
3. 教育的効果
4. 検査時間の短縮
5. 再検査の減少による患者への負担の軽減
6. チーム医療による診断（信頼関係の確立）

また、迅速診断にて腫瘍細胞が確認できない場合、腫瘍性の感染症や炎症性疾患などを疑い培養検査や化学的検査用の検体処理を追加できるのも迅速細胞診の利点といえる。

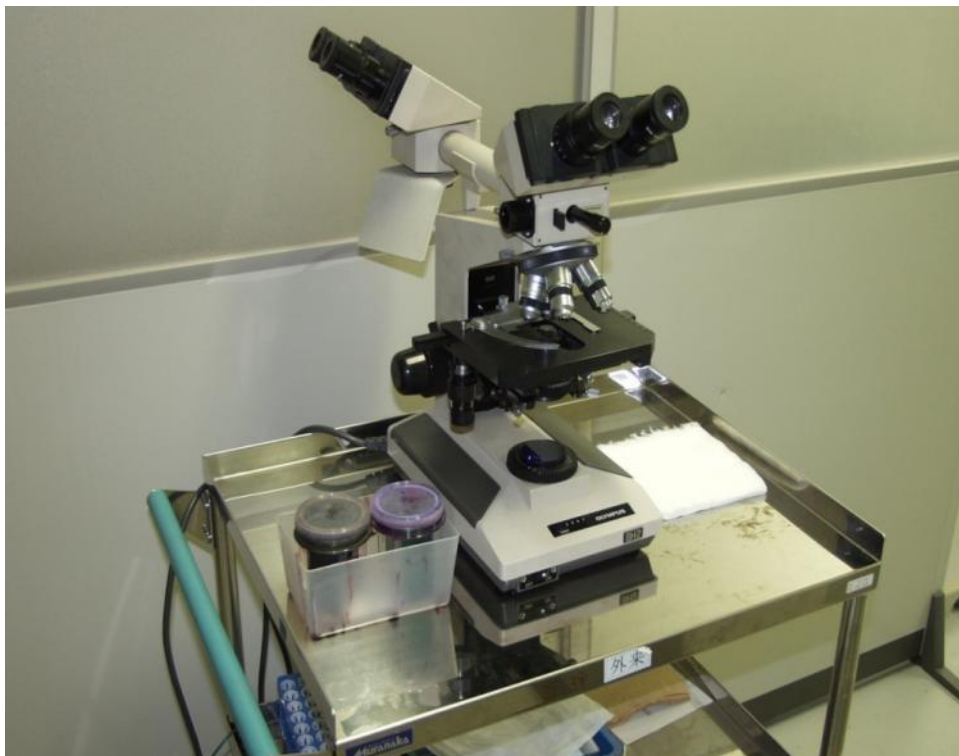


図34 迅速細胞診用セット



## 迅速細胞診断の実際

通常、気管支擦過細胞診やCTガイド下穿刺吸引細胞診に用いられるが気管支鏡下生検やCTガイド下生検材料の捺印細胞診にも応用可能である。

迅速細胞診には、数分間で染色可能なDiff-Quik 染色，迅速ギムザ染色，迅速パニコロウ染色などが用いられる。標本作製は通常の塗抹や捺印と同様である（図35～37）。

スクリーニングも通常と同様に行われるが，迅速診断であることを考慮し明らかな悪性所見を拾い上げることを重要視し深く迷わないことが肝要である。

診断までの所要時間は，3分から5分程度である。報告に関しては，正規の診断ではないため仮報告である。

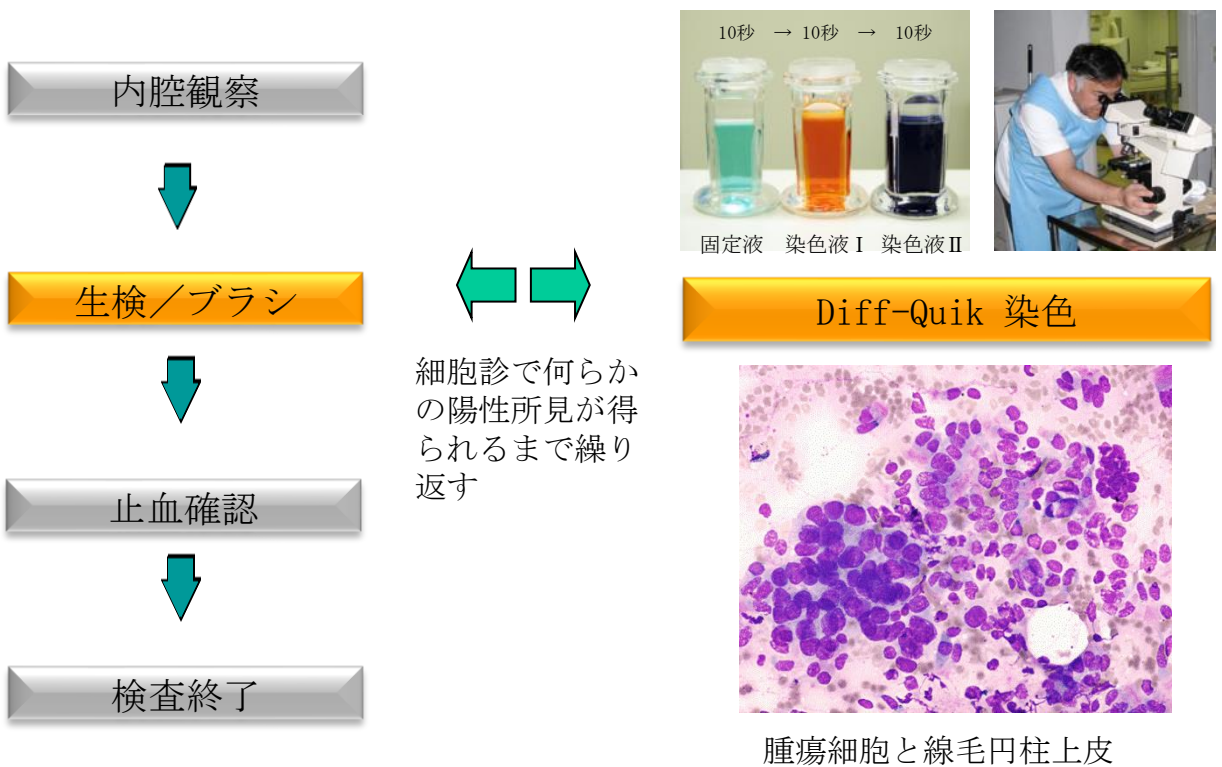


図35 Diff-Quik 染色による迅速細胞診

また、腫瘍生検では出血のリスクがあり，できれば最小限の生検回数で検査を終了したい。その場合、気管支鏡生検時の腫瘍部に生検鉗子が到達したかを確認するための有用な方法として、挿入した生検鉗子を病変部と思われる部位で軽く開き、つつく様にして生検鉗子先で細胞を触知し迅速細胞診用材料とする。腫瘍細胞が確認できれば，その部位より生検を施行する。

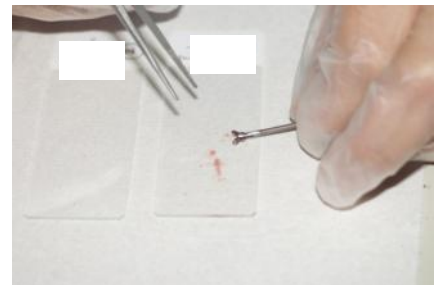
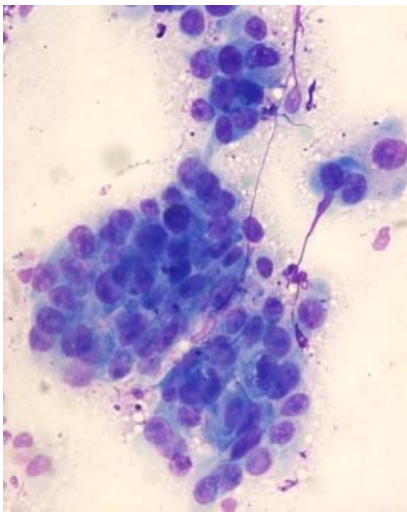
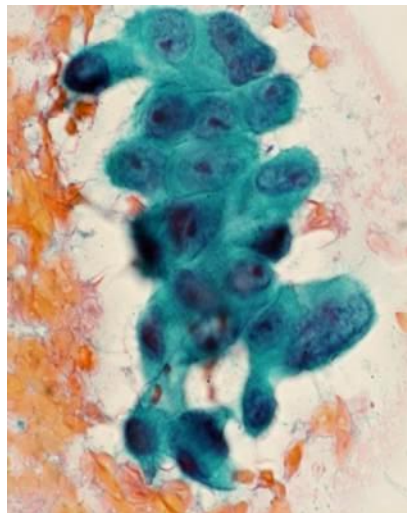


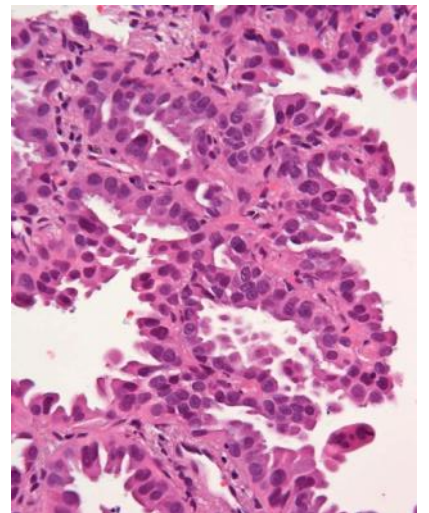
図36 生検鉗子をピンセットでつまみ叩くように塗抹



Diff-Quik染色

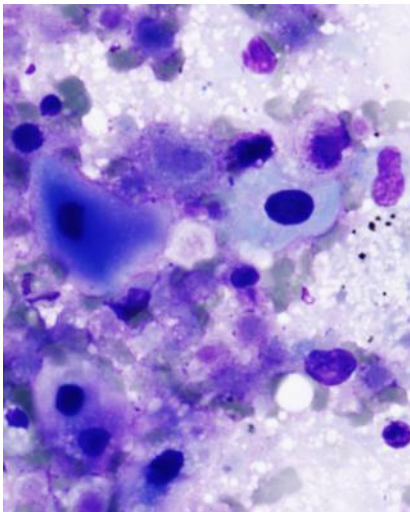


Papanicolaou染色

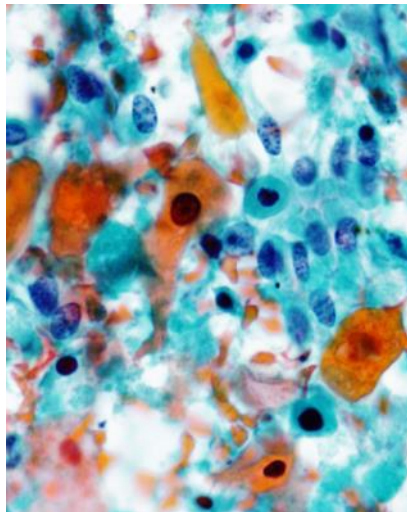


病理組織

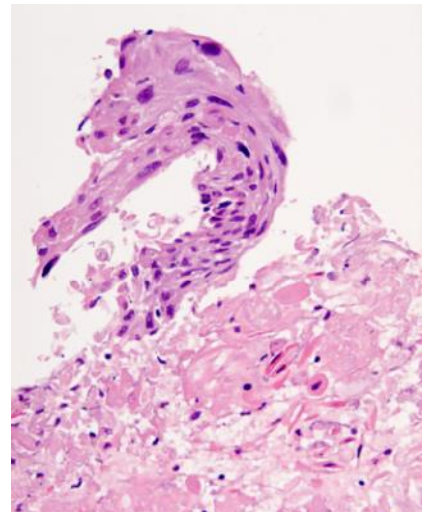
末梢肺腺癌の迅速細胞診像



Diff-Quik染色



Papanicolaou染色



病理組織

扁平上皮癌の迅速細胞診像

図37 迅速細胞診像

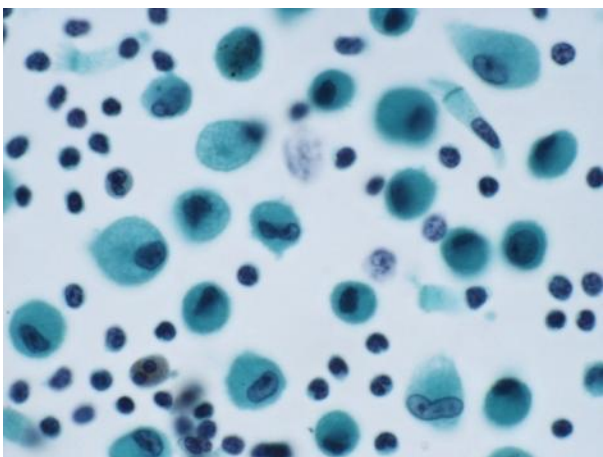
## 6. 気管支肺胞洗浄, BAL (BronchoAlveolar Lavage)

気管支鏡を用いて、肺内に滅菌生理食塩水を注入し、回収した液（洗浄液）を細胞数、細胞分類、細菌培養、フローサイトメトリーなどの検査によって解析することで、びまん性肺疾患の診断や病態を明らかにするための検査である。細胞観察は通常Giemsa系染色標本で行う。

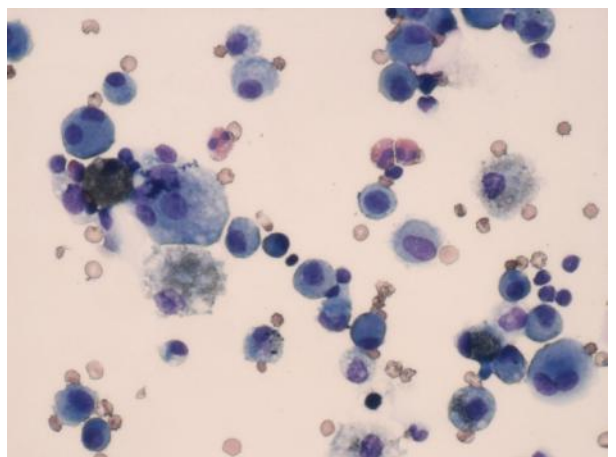
気管支肺胞洗浄の対象となる呼吸器疾患には、特発性間質性肺炎、過敏性肺炎、膠原病性間質性肺炎、薬剤性肺炎、好酸球性肺炎、サルコイドーシス、じん肺、肺癌（肺炎の形態を示すもの）、肺炎、リンパ腫や白血病などに合併する肺病変、肺移植後の拒絶反応などが含まれる。その他にも肺の中に広範に広がる病変をおこす様々な病気が含まれる。

感染症では回収洗浄液を培養し、腫瘍性の病変の場合は悪性細胞の有無を顕微鏡的に観察、診断する。それ以外の多くのびまん性肺疾患では、回収された洗浄液を解析することで、病変の種類や程度を判定する。

細胞数は通常、細胞数×10の5乗/mlであらわすが、これは回収された洗浄液量と塗抹標本上の細胞数から半定量的に求める。厳密な定量的細胞数算定を行うわけではないので、明確な正常値（基準値）はない。しかし、気管支、肺胞に異常がなければ異型に乏しいいくらかの気管支上皮や肺胞組織球を認めるのみで、白血球増加は認めないとされている。なお、細胞分類は血液像と同様に出現している炎症細胞についてのみ行う。



Papanicolaou染色



Giemsa染色

図38 気管支肺胞洗浄液（BALF）の細胞像

# 気管支肺胞洗淨（BAL）正常値 と各種疾患での特徴

気管支肺胞洗淨の細胞分画，CD4/8比の正常値と各種疾患での特徴

|                      | 非喫煙者    | 喫煙者     |
|----------------------|---------|---------|
| 総細胞数（ $10^5$ /ml）    | 0.2-1.0 | 1.0-9.0 |
| <b>細胞分類</b>          |         |         |
| 組織球                  | 75-95   | 92-99   |
| リンパ球                 | 4-25    | 2-5     |
| 好中球                  | <3.0    | <3.0    |
| 好酸球                  | <1.0    | <1.0    |
| <b>T cell subset</b> |         |         |
| CD4+                 | 33-57   | 19-37   |
| CD8+                 | 14-28   | 27-54   |
| CD4/CD8              | 1.5-3.2 | 0.4-1.0 |

リンパ球の増加：

- \* 過敏性肺臓炎
- \* サルコイドーシス
- \* ウイルス性肺炎
- \* マイコプラズマ肺炎
- \* 非特異性肺炎

好中球の増加：

- \* 細菌性肺炎
- \* びまん性汎細気管支炎
- \* 気管支拡張症
- \* 成人呼吸促進症候（ARDS）
- \* 特発性肺線維症（IPF）
- \* 特発性器質化肺炎

好酸球の増加：

- \* 好酸球性肺炎
- \* 薬物性肺炎
- \* 剥離性間質性肺炎（DLP）

CD4/CD8 比の増加：

- \* サルコイドーシス
- \* 過敏性肺臓炎（農夫肺）
- \* 肺ランゲルハンス細胞組織球症

CD4/CD8 比の減少：

- \* 夏期型過敏性肺臓炎
- \* 後天性免疫不全症候群（AIDS）
- \* 粟粒結核症

## 気管支・肺胞洗浄液の検体処理

気管支・肺胞洗浄液は粘液の泡沫状部分が最上層に残るので、粘液融解剤を添加する。粘液融解剤を添加するかわりに、高速ブレンダー処理をしても良い。血性検体には溶血剤を添加する（図39）。そのまま遠心して最上層の泡沫部分をピペットで吸引し、スライドガラス2枚で擦り合わせ塗抹すると変性の少ない細胞が得られる。残りは粘液融解処理をすると良い。また、気管支・肺胞洗浄は剥離しやすいため、シランなどの剥離防止剤をコーティングしたスライドガラスに塗抹し、コーティング固定することが望ましい。

### \*粘液融解法

気管支・肺胞洗浄液に粘液融解剤を等量以上添加後、充分に転倒混和し、1～5分後、遠心し沈渣を擦り合わせ塗抹する。粘液融解剤を添加するかわりに、高速ブレンダー処理を行っても良い。粘液融解剤は、Dithio-threitol (SIGMA) を用いた場合、100mlの生理食塩水に対し、小さじ1杯の割合に加える。その他市販の粘液融解剤も使用可能である。

### \*溶血法

血性検体には溶血法を付加する。洗浄液に溶血剤を直接等量混和し、溶血するのを待つ、溶血しない時には、遠心して上清を捨てて溶血操作を繰り返す。溶血したら粘液融解剤を添加し、同様に遠心後塗抹する。溶血剤には1) 0.9% 塩化アンモニウム、2) 1.4% シュウ酸アンモニウム、3) サポニン などがある。1) は時間がかかるが核の変性が少ない、2) は溶血時間は中間的で細胞質の変性、核の変性が強い、3) 適切な量では細胞質の変化や核の変形が少ないなどの特徴がある。

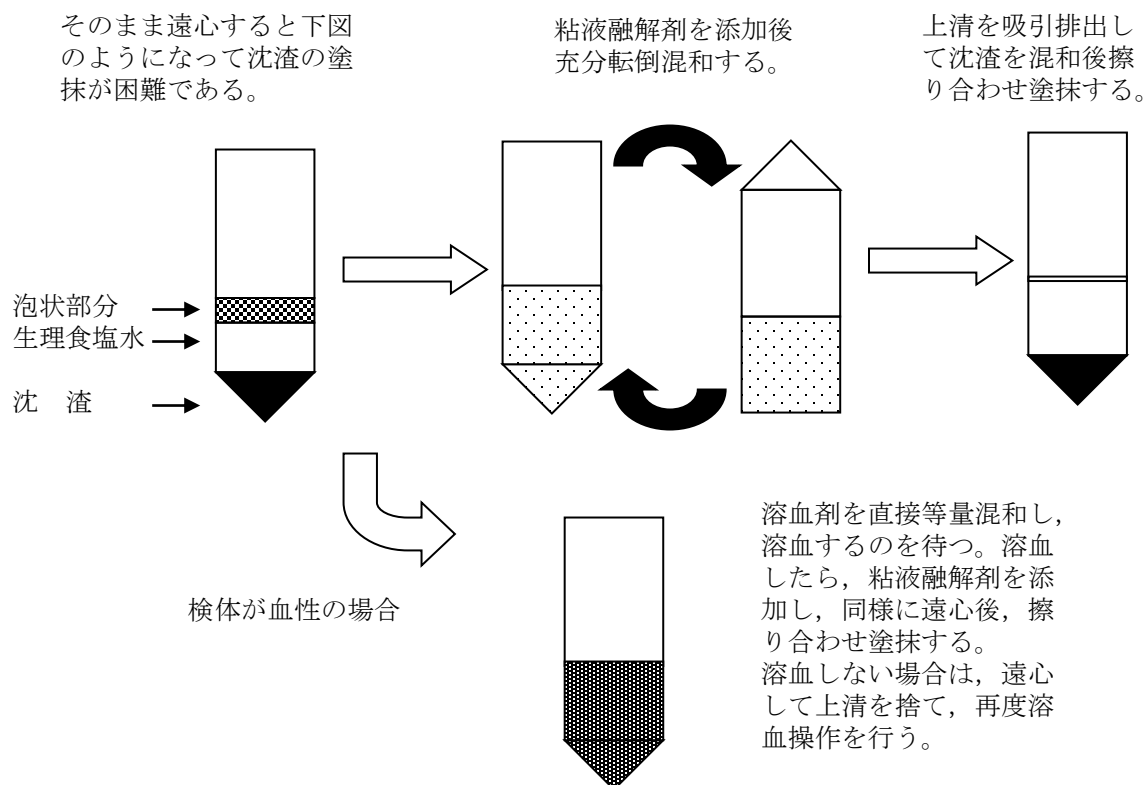


図39 粘液融解法および溶血法

## \*付説 1. 診断への免疫染色の応用

### 1. 原発性肺癌の免疫染色による鑑別

|                | 腺癌 | 扁平上皮癌 | 大細胞癌  | 小細胞癌 |
|----------------|----|-------|-------|------|
| p63            | —  | +     | — / + | —    |
| CK5/6          | —  | +     | —     | —    |
| CK14           | —  | + / — | —     | —    |
| TTF-1          | +  | —     | + / — | +    |
| SPA            | +  | —     | —     | —    |
| NapsinA        | +  | —     | —     | —    |
| CD56 (NCAM)    | —  | —     | —     | +    |
| Synaptophysin  | —  | —     | —     | +    |
| Chromogranin A | —  | —     | —     | +    |

#### 神経内分泌腫瘍の鑑別 (SCLCとLCNEC)

SCLC . . . . CK7陰性 E-カドヘリン陽性

LCNEC . . . . CK7陽性 E-カドヘリン陰性

## 2. 転移性肺癌の免疫染色による鑑別

|               | 肺腺癌 | 大腸癌 | 乳癌 | 甲状腺癌 | 腎癌 |
|---------------|-----|-----|----|------|----|
| CK7           | +   | -   | +  | +    | -  |
| CK20          | -   | +   | -  | -    | -  |
| TTF-1         | +   | -   | -  | +    | -  |
| SPA           | +   | -   | -  | -    | -  |
| NapsinA       | +   | -   | -  | -    | +  |
| CDX2          | -   | +   | -  | -    | -  |
| GCDFP-15      | -   | -   | +  | -    | -  |
| MBG1          | -   | -   | +  | -    | -  |
| Thyroglobulin | -   | -   | -  | +    | -  |
| CD10          | -   | -   | -  | -    | +  |
| EGFR mutation | +   | -   | -  | -    | -  |

### 腺癌の鑑別

CK7+, CK20+: 膀胱癌  
 CK7-, CK20+: 大腸癌, メルケル細胞癌  
 CK7-, CK20-: 肝癌, 腎癌(淡明細胞)  
 CK7+, CK20-: 多くの腺癌

### 乳癌との鑑別

estrogen receptor (ER) 原発性肺癌の15-20%  
 GrossCystic Disease Fluid Protein-15 (GCDFP-15)  
 Mammaglobin/MGB1  
 HER-2

### 消化器癌との鑑別

#### 大腸癌

CK7(-) 粘液産生肺癌  
 CK20(+)  
 CDX2(+)

大腸原発巣が粘液癌の場合は鑑別は困難。

#### 胃癌

CK7(+~±)  
 CK20(+~±)  
 CDX2(+~±)

### 悪性中皮腫

calretinin 細胞質及び核が陽性  
 D2-40 卵巣の漿液性腺癌の65%がD2-40陽性  
 WT-1 核が陽性  
 CK5/6

## \* 付説 2. EGFR遺伝子検索

近年、分子標的治療薬として、上皮成長因子受容体 (EGFR) に特異的なチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) であるゲフィチニブ (イレッサ®) が2002年の夏に承認されて5年半が経過し、2007年の末にはエルロチニブ (タルセバ®) が承認された。これらの薬物は化学療法の不応例にもしばしば劇的な臨床症状および画像上の改善をもたらすため、EGFR遺伝子の検索は呼吸器系検体において欠かせないものとなっている。

EGFR遺伝子検査は保険収載されているものの、この検査の実際については各地域、病院ごと、主治医ごとにばらばらに行われているのが実情であり、細胞診検体においても検索が可能であるため、それぞれの検体の特性を理解し、検査を行う必要がある。

### EGFR遺伝子検査に用いられる臨床検体とその取扱い

EGFR遺伝子検査は検査方法によって感度が異なる。また、対象となる検体によって含まれる腫瘍細胞数や腫瘍細胞の確認の方法も異なる。腫瘍細胞を反映した結果を得るためには、検査会社に提出する際に腫瘍細胞の存在を確認することが重要であり、検査の依頼をした医師と病理検査室との密接な連携が必要となる。

#### (1) 生検組織のパラフィン切片

暑さ10 $\mu$ 程度の切片を5枚作製、そのうちの1枚をHE染色し腫瘍細胞の存在を確認することが望まれる。

特にTBLB標本では、病理診断の後に再薄切して作成した標本では腫瘍細胞がなくなってしまうことがあるので注意を要する。

あらかじめEGFR変異検査を行う予定の場合は標本作製時に未染標本を余分に作ってもらうことも有用である。PCRを用いた高感度の検出系ではDNA中に1%程度腫瘍細胞由来DNAが含まれていれば変異の検出が可能であり、ほとんどの生検病理標本で問題はない。

長時間 (1週間以上) ホルマリンに浸漬していた検体ではDNAは断片化されてしまい、検出不能である。

#### (2) 気管支洗浄液, 胸水, 心嚢液

腫瘍細胞の確認が必須であり、細胞診や臨床検査に提出した残りの材料を遺伝子検査用に冷蔵・冷凍保存する。細胞診検体では癌細胞含有量が低い場合があるため、高感度法を用いることが重要である。



### (3) 経気管支擦過細胞，経気管支穿刺吸引細胞やリンパ節穿刺吸引細胞，喀痰

擦過ブラシや穿刺針，喀痰を生食やPBSでよくサスペンドしたのち半分に分け，一方を細胞診検査に提出し，残りを遺伝子検査用に冷蔵・冷凍保存する。喀痰は検体自体がすでに変性している可能性があるため検出率が低く，検体間の腫瘍細胞量の差が著しいため高感度法を用いる必要がある。

### (4) 細胞診鏡検用の標本検体

上記検体から作製されたPapanicolaou染色後の細胞診標本から腫瘍細胞を採取し，遺伝子検査に提出する。腫瘍細胞の存在を確認し，腫瘍細胞が標本全体の約1%以上のものを用いる。カバーガラスを外したうえで，キシレンにて封入剤を十分取り除いた後，標本を乾燥させる。スライドガラスから塗抹されている腫瘍細胞を削り取り，遺伝子検査を行う。腫瘍細胞量が少ないため，高感度法を用いる必要がある。

### EGFR遺伝子検査の種類

様々な検査法があり，細胞診に適している代表的な高感度の検査法を下記に示す。

- ・PNA LNA PCR-Clamp法
- ・PCR-Invader法
- ・Scorpion ARMS法
- ・SMAP法

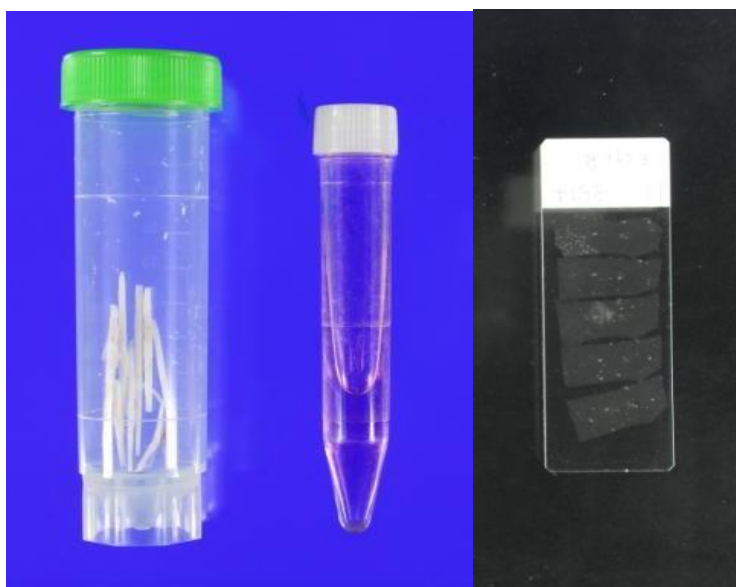


図40 EGFR検査の提出用検体の種類

## 付説 3. 呼吸器感染症

**呼吸器感染症**：カンジダ，クリプトコッカス，アスペルギルス三者共に肺炎を起こし得るので咳嗽，喀痰，血痰などがある。

**画像所見**：カンジダ症では特徴的な像はない。アスペルギローマは肺結核，肺膿瘍などの遺残空洞の中に菌糸が増殖するため球状塊（fungus ball）を作る。

アスペルギルス肺炎に特徴的な像はないが，慢性化すると限局化する傾向。

クリプトコッカス肺炎は限局性で腫瘤状陰影を呈すること多い。

コクシジオイデスでは間質性肺炎や空洞形成。

ブラストミセス症では縦隔より拡がる大きな陰影。

1) アスペルギルスではアスペルギローマの形を取ることも，肺炎の形を取ることもある。

アレルギー性気管支肺アスペルギルス症は，気道粘膜にコロニー化したアスペルギルスに対するアレルギー反応から，喘息発作，肺浸潤を生ずる。肺アスペルギローマでは胸レ線，喀痰培養，沈降抗体の証明。その他の深在性アスペルギルス症では診断が容易でない。

例えば全身性アスペルギルス症で肺病変があっても，喀痰からは培養されにくい。

クリプトコッカス髄膜炎が疑われる場合は，沈渣を墨汁（インジアナインク）で染色して，厚い莢膜で被われた酵母細胞を証明すれば，診断に至る。

2) ヒストプラズマ，コクシジオイデス，ブラストミセスなどでも咳嗽，胸痛，呼吸困難などがある。

ヒストプラズマ症：肺，鼻腔，口腔咽頭，肺，脾，リンパ節などの病変。皮内反応や抗体検査。全身性ヒストプラズマ症の場合，口腔内病変，リンパ節，骨髄，喀痰などの培養は陽性率が高い（60～90%）。

コクシジオイデス症：肺，関節，皮膚，髄膜などの病変。皮内反応，抗体測定。喀痰やその他浸出液を10%KOH処理した後，内生孢子を放出する球体状をみれば確定。

ブラストミセス症：肺，皮膚，骨（肋骨や椎骨），副睾丸，前立腺などの病変，喀痰，前立腺液などを10%KOH処理した後検鏡し，特徴的像を確認。培養は可能であるが1ヶ月ほどかかる。

## 参考文献

- 1) 畠山重春, 島崎明子, 戸谷恵美子, 加賀谷 晃: 喀痰細胞診の成績と塗抹法について, 衛生検査 33:1580~1584, 1984
- 2) 畠山重春, 川名展弘, 松元照美: 【病理組織・細胞診実践マニュアル】 検体の受付と処理検査と技術 26巻7号: 190~195, 1998
- 3) 古田則行, 都竹正文: 正しい細胞診標本作製法. 病理と臨床 20:17~24, 2002
- 4) 西 国広. 一基礎から学ぶ一細胞診のすすめ方. 近代出版 75~78, 2001
- 5) 上野喜三郎, 斎藤 豊, 久保山明子, 大塚重則, 田中 昇: 喀痰細胞診における私の工夫-検体処理と標本作製, 日臨細胞誌東京都支部会会報 13:21~24, 1995
- 6) 原田弥生, 山岸克博, 牛島友則: 【病理組織・細胞診のための一日常染色法ガイドンスー】 細胞診の日常染色法-パパニコロウ染色-, 検査と技術増刊号 29巻7号:934~936, 2001
- 7) 近 京子, 中嶋隆太郎, 小野寺美枝, 白鳥まゆみ, 佐藤博俊 ほか: 早期肺扁平上皮癌のスクリーニングと判定における細胞質染色性の光輝性の意義と染色法の検討, 日本臨床細胞学会雑誌 38:15~22, 1999
- 8) 佐藤雅美, 斎藤泰紀, 鈴木隆一郎, ほか: 喀痰細胞診を用いた肺癌検診の精度管理の成績, 日本臨床細胞学会雑誌 36巻6号:568~575, 1997
- 9) 前川芳明ほか: 各種瀰漫性肺疾患と気管支肺胞洗浄液中の細胞成分との関係. 医学検査10: 1542~1545, 1995
- 10) 塚本孝久ほか: 瀰漫性肺疾患における気管支肺胞洗浄液中の細胞形態学的ならびに免疫細胞化学的検討. 医学検査vol. 46, No. 8: 1215~1218, 1997
- 11) 佐藤正和, 福田智, ほか: 気管支鏡検査における迅速細胞診 (D i f f - Q u i k 法) の有用性について; 日本臨床細胞学会岡山支部会誌, 巻: 2 3 頁:25-26, 2004-12-01
- 12) 前田昭太郎, 横山宗伯, 他: 臨床に呼応した迅速細胞診. 日本医科大学医学会雑誌2005;1: 102-109
- 13) 田中良太, 中里宣正, ほか: 肺野末梢病変に対する迅速細胞診を用いた気管支鏡下生検の有用性. 気管支学: 日本気管支研究会雑誌 28(8), 557-560, 2006-12-25
- 14) 羽場礼次: 呼吸器ベッドサイド細胞診の有用性. 肺癌: 巻: 5 0 号: 5 頁:470, 2010-10-05
- 15) 佐藤利雄, 藤原慶一, 松尾潔, 米井敏郎: 非小細胞肺癌-診断から治療まで, 日本医事新報, No. 4509; 65-68, 2010-09-25
- 16) 日本肺癌学会 肺癌診療ガイドライン: 2011-061
- 17) 日本肺癌学会: 肺癌患者におけるEGFR 遺伝子変異検査の解説, 第1.7 版, 2009-05-11

新呼吸器マニュアル作成小委員会

委員長：三宅康之（倉敷芸術科学大学 生命科学部 生命医科学科）

委員：佐藤正和（国立病院岡山医療センター 臨床検査科病理）

伊藤 智（秋田大学医学部附属病院 病理部）

松本慎二（福岡大学病院 病理部）

柿沼廣邦（北里大学病院 病院病理部）

小川勝成（広島大学病院 診療支援部 病理検査部門）

表紙作成：藤田 勝（岡山大学医学部歯学部附属病院）

協力施設（順不同）

北海道対がん協会細胞診センター：福島県保健衛生協会：千葉県対がん協会：群馬県健康づくり財団：石川県 成人病予防センター：岡山県健康づくり財団：鳥取保健事業団：香川県総合健診協会：結核予防会福岡支部：熊本県成人病予防協会：厚生連高岡病院：富山県医師会健康管理センター：富山労災病院：富山医科薬科大 学附属病院：富山赤十字病院：社会保険高岡病院：氷見市民病院：市立砺波総合病院：富山市民病院：富山県立中央病院：宮城県対がん協会細胞診センター：仙台厚生病院：新潟県立がんセンター：二市北蒲原郡総合健康開発センター：日本ノーバメディカル研究所：富山県健康増進センター：大阪府立羽曳野病院：国立病院岡山医療センター：秋田大学医学部附属病院：福岡大学病院：北里大学病院：広島大学病院

## 第2版 細胞診標本作製マニュアル（呼吸器）

2012年4月1日発行 第2版第1刷

発行者 細胞検査士会 会長 畠山重春

本書の内容を無断で複写・複製・転載すると、著作権・出版権の侵害となることがありますので御注意下さい。

