

口腔粘膜病変における液状化細胞診の検討

落合 隆永¹, 中野 敬介^{1,2,3}, 木村 晃大^{1,3}, 相澤 聡一³, 福沢 正人⁴,
上松 隆司⁵, 古澤 清文⁵, 川上 敏行^{2,3}, 長谷川博雅^{1,3}

¹松本歯科大学 口腔病理学

²松本歯科大学 総合歯科医学研究所 病態解析学

³松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

⁴松本歯科大学病院 検査科病理

⁵松本歯科大学 口腔顎顔面外科学

The examination of liquid-based cytology in oral mucosal lesions

TAKANAGA OCHIAI¹, KEISUKE NAKANO^{1,2,3}, AKIHIRO KIMURA^{1,2}, SOHICHI AIZAWA³,
MASATO FUKUZAWA⁴, TAKASHI UEMATSU⁵, KIYOFUMI FURUSAWA⁵,
TOSHIYUKI KAWAKAMI^{2,3} and HIROMASA HASEGAWA^{1,2}

¹*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

²*Hard Tissue Pathology Unit, Matsumoto Dental University Institute for Oral Science*

³*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

⁴*Laboratory of Surgical Pathology, Matsumoto Dental University Hospital*

⁵*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

Summary

The aim of this study was to evaluate the utility of liquid-based cytology (LBC) for diagnosis of oral mucosal lesions, compared with the conventional smear cytology. Specimens were taken from the same patient by the both conventional and LBC preparation methods. Samples were stained with papanicolaou and PAS stainings according to standard methods. RNA and protein were isolated from LBC samples. The cytological features of LBC samples showed similar quality to those of conventional ones. In addition, RNA and protein could be detected from LBC samples. In conclusion, LBC specimens are useful not only for cytological diagnosis but also for gene and protein analyses in oral lesions.

緒 言

擦過細胞診は、生検よりも外科的侵襲が少ない

ため被験者にとって負担が少なく病変部の細胞状態を観察できる優れた検査方法であり、口腔領域だけでなく婦人科や呼吸器科などで広く普及して

いる。婦人科領域では、子宮がん検診で細胞診を検査方法として使用し、病変の早期発見に繋がりに死亡率が低下することは知られている¹⁾。しかし、細胞診の診断は熟練が必要であり、診断に苦慮する症例も多くみられる。また、採取細胞の状態によって診断が困難となることも少なくない。こうしたことから、最近では検体および診断の規格化が進められ、米国ではベセスダシステムを導入することによって精度管理を行っている²⁾。本邦においても婦人科領域の細胞診ではベセスダシステムを用いた診断が普及しつつある³⁾。

細胞診の細胞採取には、ブラシ、綿棒、穿刺吸引等が用いられ、採取細胞を直接スライドガラスへ塗抹することによって細胞を診断する直接塗抹細胞診 (conventional cytology) が多く用いられている。しかし、細胞塗抹時に細胞の乾燥や破壊などによって診断困難な不適切標本が存在するなどの問題点がある^{4,5)}。そこで近年、検体の精度管理に有効である液状化細胞診 (Liquid-Based Cytology, LBC) 法の導入が勧められている³⁾。LBC法は、採取細胞を液状化処理し標本作製を行う方法である。従来の直接塗抹細胞診に比べ検体の均一化、検鏡・診断時間の短縮や不適切標本の減少などの利点が挙げられているが、標本作製の手技が煩雑で、試薬等が高価なことなどが問題点として指摘されている^{4,5)}。一方で、LBC法は、細胞検査だけでなく、ウイルス感染等の検査にも応用可能で、子宮頸癌の発生に関与するといわれる HPV の同定にも使用されている⁶⁾。

婦人科領域での LBC 法は普及しつつあるが、口腔領域で実施する施設はいまだに少ない^{7,8)}。そこで、口腔領域における LBC 法の細胞診断と分子生物学的診断への有用性を検討した。

方 法

細胞診標本の作製

擦過細胞診を必要とする成人の検査対照者 5 例と、口腔粘膜に病変を持たない成人 1 例の細胞を用いた。通常の擦過細胞診と同様に、口腔粘膜を歯間ブラシで擦過して細胞を採取した。LBC 法は SurePath™ 法 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) の BD サイトリッチ標本作製手順に準じて行った。今回我々は、SurePath™ 法に若干の方法を改変した我々独自の变法 (以下

MDU 变法) を用いた。MDU 变法では、2 ml の SurePath™ 保存液サイトリッチブルーを分注した 5 ml のサンプルチューブ (BIO-BIK, 大阪) を用いた。採取細胞は、歯間ブラシに付着させたまま 5 ml のサンプルチューブ内の保存液中に浸漬し、常温で 30 分間固定を行った。固定後、攪拌機にて歯間ブラシから細胞を完全に分離した後に、ブラシを除去した。保存液を常温で 800G, 10 分間遠心分離した後に上清を除去し、スライド硝子 1 枚につき精製水 200 μ l の割合で懸濁した。専用のラックとチャンバーは使用せず、プレコートスライド (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) にダコペン (Dako, Glostrup, Denmark) にて細胞塗抹範囲 (25 x 25 mm) を設定し、懸濁液を分注し 10 分間静置した後に、95% エタノールにて固定を行った。染色は通法に従い、パパニコロウ染色および PAS 染色を行った。対照群は、直接塗抹細胞診標本を用いて比較した。

RT-PCR

採取した細胞を SurePath™ 保存液サイトリッチブルーで常温 30 分間固定した。固定後 800 G, 10 分間遠心分離し、上清を除去し実験に用いた。対照には、未固定の細胞を用い、PCR 反応には陽性コントロールを用いた。Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) を 500 μ l 加えフェノール・クロロフォルム法にて total RNA を抽出した。SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, USA) の製品プロトコールに従って cDNA を合成し、ハウスキーピング遺伝子である Human β -actin RT-PCR primer set (TOYOBO, 大阪) 増幅長 645 bp と Human G 3 PDH RT-PCR primer set (TOYOBO, 大阪) 増幅長 983 bp のプライマーにて PCR 法で DNA を増幅した。PCR 反応液は、Premix Taq® TAKARA EX Taq (TAKARA, 滋賀) 25 μ l にプライマー各 1 μ l (0.4 μ M), template DNA 各 1 μ l を加え、陽性コントロールには primer set に付属の Positive Control DNA を 1 μ l (10⁷ copies/ μ l) 加え、nuclease 不含水で全量 50 μ l に調製した。PCR 反応は、95°C で 3 分間を予備加熱とし、95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間を 35 サイクル行い最後に 72°C で 7 分間伸長反応を行った。各 PCR 産物 10 μ l を DNA サイズマーカー (100 bp DNA Ladder, TAKARA, 滋賀) と共に 2% アガ

ロースゲル (アガロース ME, 岩井化学, 東京) にて100Vで30分間電気泳動 (i-Mupid J, Advance, 東京) の後に, エチジウムブロマイドで染色を施し紫外線照射下にて撮影した。

Western blot

採取した細胞を SurePath™ 保存液サイトリッチブルーで常温30分間固定した。固定後に常温で800G, 10分間遠心分離した細胞を Sample Buffer (invitrogen, Carlsbad, USA) で溶解し, タンパク質を抽出した。細胞採取後に未固定で Sample Buffer に溶解した細胞を対照とした。NuPAGE® MES SDS Running Buffer (invitrogen, Carlsbad, USA) を用い, NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel (invitrogen, Carlsbad, USA) で SDS-PAGE を行った。泳動終了後, タンパク質をセミアウエット法にて polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (invitrogen, Carlsbad, USA) に30V, 80分間で転写した。転写終了後, 5% skim milk を含む0.1% Tween 20/TBS 緩衝液を用いて常温で60分間ブロッキングを行った。0.1% Tween 20 を含む TBS 緩衝液で3回洗浄後, 抗 Cytokeratin 5 抗体 (Leica, Newcastle, UK) を4℃, 12時間反応させた。抗体の希釈倍率は, 1:1000で行った。その後, 0.1% Tween 20 を含む TBS 緩衝液で3回洗浄し, horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を常温で60分間反応させた。0.1% Tween 20 を含む TBS 緩衝液で3回洗浄し, ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を作用させ, X線フィルム上でタンパク質を検出した。

結 果

LBC法では, 多数の多角形で小型核を有する表層細胞がパパニコロウ染色で確認できた。これらの細胞は, オレンジGで淡赤色ないし橙赤色に染色する上皮表層細胞とライトグリーンで淡青緑色に染色される表層細胞に染め分けされた (図1A)。直接塗抹標本でも同様に上皮表層細胞が採取され, 染色性も淡赤色ないし橙赤色に染色される細胞と淡青緑色に染色される表層細胞に染め分けされた (図1B)。直接塗抹標本と比較してLBC法は, 1視野で観察される細胞数は多かった (図1A, B)。LBC法では, 赤血球は淡赤色

に染まり軽度に溶血し, 赤血球が上皮細胞等と重なること無く細胞観察が容易に行えた (図1C)。一方, 直接塗抹標本の赤血球は赤色に染まり, 他の細胞と重なることで細胞観察が困難だった (図1D)。LBC法での傍基底細胞は, 濃青緑色に染色される核および暗青紫色から暗赤色に染色される核小体が観察できた (図1E 矢印)。直接塗抹標本でもLBC法と同様に, 核や核小体が明瞭に確認できた (図1F 矢印)。LBC法は, 細胞観察に障害となる過度な染色性の悪化や細胞の破壊等はみられなかった。しかし, 細胞の形態はLBC法で採取された細胞が軽度に萎縮し, 染色性もやや過染色される傾向があった (図1E, F)。

LBC法のPAS染色では, 青紺色に染色される核を持つ上皮細胞が観察された (図2A)。上皮細胞内には赤紫色に染色されるカンジダの仮性菌子が明瞭に確認できた (図2A 矢印)。直接塗抹標本の上皮細胞においてもLBC法と同様の染色性を示し (図2B), 仮性菌糸の染色性にも明らかな違いはなかった (図2B 矢印)。

LBC法で固定を行った細胞から抽出した遺伝子は全例で, β -actin は645bpに, G3PDH は983bpにバンドを確認した (図3)。未固定細胞からも同様に β -actinとG3PDHを検出した。陽性コントロールは, β -actin の645bp, G3PDH の983bpに一致してバンドを認めた (図3)。LBC法と未固定の細胞から抽出した遺伝子は, 陽性コントロールと同じ増幅長を得た。しかし, LBC法では, β -actin に比べG3PDHのバンドがやや細く, G3PDHの検出率が劣る傾向が伺えた。

LBC法で固定した細胞は, 58kDaにCytokeratin 5のバンドを検出した。未固定の細胞も同様にCytokeratin 5を検出した。LBC法と未固定の細胞共に全例でタンパク質が検出された (図4)。だが, LBC法に比較し, 未固定の細胞ではややバンドが薄かった。未固定の細胞では, 検出感度が劣る傾向が伺えた。

考 察

細胞診検査において液状化細胞診が注目され普及しつつある。本研究では, 口腔粘膜病変に対して擦過細胞診が必要とされた症例について直接塗抹法とLBC法を細胞学的に比較し, さらにLBC

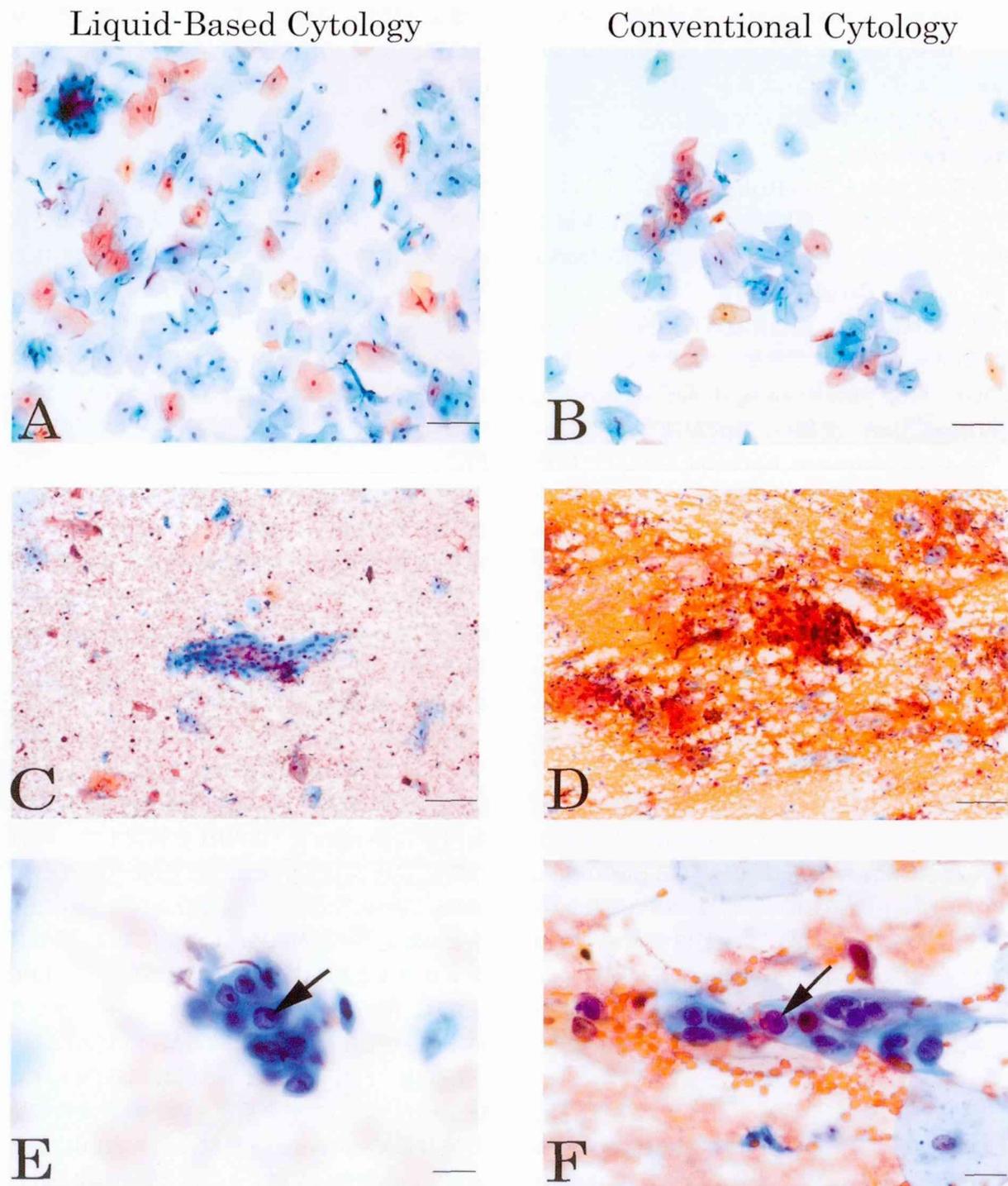


図1: 直接塗抹法とLBC法のパパニコロウ染色

オレンジGに好染の表層細胞からライトグリーンに淡染する中層細胞がLBC法(A)と直接塗抹法(B)で染色された。出血性背景は直接法に比べLBC法では軽減され細胞観察が容易であった(図C, D)。核の形態や染色性はLBC法(図E)と直接塗抹法(F図)で差は無く、核小体も明瞭であった(図E, F矢印)。

スケールバー: 50 μ m (A, B, C, D)。スケールバー: 10 μ m (E, F)。

Liquid-Based Cytology

Conventional Cytology

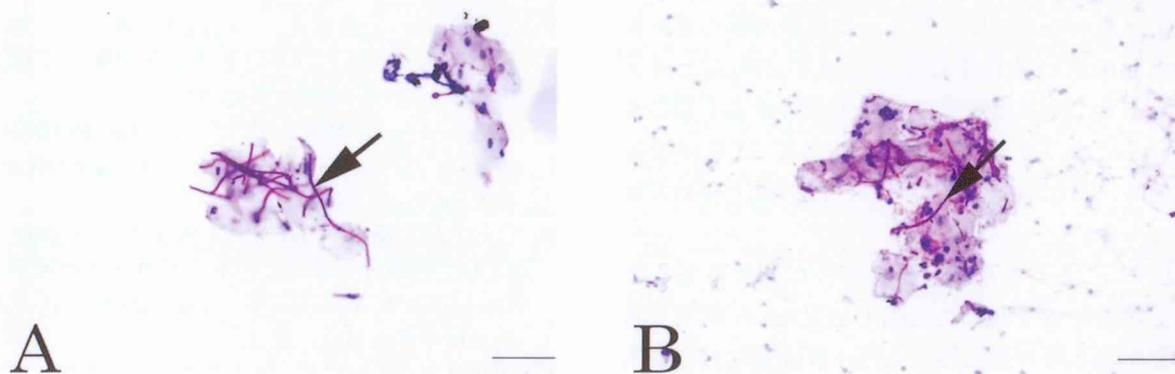


図2：直接塗抹法とLBC法のPAS染色
PAS染色にて *Candida albicans* の仮性菌糸(矢印)が明瞭に判別できた(A, B)。
スケールバー：50 μ m (A, B)。

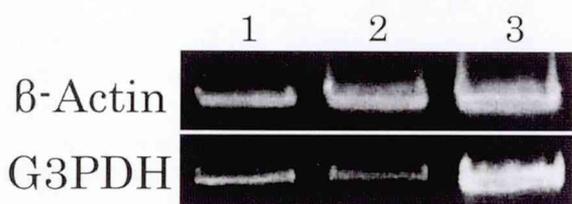


図3：RT-PCR法による遺伝子発現の検出
 β -actinとG3PDHのmRNAは、LBC法、未固定および陽性コントロールで検出した。
レーン1：LBC法、レーン2：未固定、レーン3：陽性コントロール



図4：Western blotによるタンパク質検出。
Cytokeratin 5をLBC法と未固定の検体より検出した。
レーン1：LBC法、レーン2：未固定

法の分子生物学的な診断への応用を検討した。

現在、日本で主に使用されているLBC法にはSurePathTM法、ThinPrep[®]法、TACASTM法がある³⁾。いずれのLBC法でも、標本作製に煩雑な手順ないし高価な専用機器が必要であるという欠点がある。特にThinPrep[®]法では、塗抹操作が自動化されるが、専用の標本作製機器ThinPrep[®]プロセッサが必要で、検体数の少ない施設では経費的な理由で導入が困難である。一方、ThinPrep[®]法は検体処理の精度管理が良好であり、短時間で標本作製が可能である。他のLBC法でも細胞塗抹操作には専用のホルダー等が必要とされる。我々のMDU変法でも、採取した細胞を固定液中に浸漬した後に遠心分離を行うため、遠心分離機などの機器が必要であるが、スライドガラスへの塗抹手技は細胞塗抹範囲をペンで設定するだけと容易で、設備投資も安価なので、いかなる施設でも実施可能であろう。

今回、パパニコロウ染色とPAS染色を行い比較したが、直接塗抹法とLBC法の染色性に大き

な差異は無かった。細胞の形態については、細胞学的にLBC法では、細胞が軽度萎縮し、核がやや過染される傾向がみられたが、その変化は僅かであり診断上問題はなかった。細胞採取量に関する報告では、直接塗抹法に比べLBC法はより多くの細胞をスライドガラスに塗抹できるために、病変の全体像の把握には優れた方法であると報告されている⁹⁾。本研究においてもLBC法では、1視野で観察される細胞数が多かった。これは、採取細胞の多くを効率良くスライドガラスに塗抹でき、なおかつ細胞塗抹範囲の狭いLBC法の利点が反映されたのであろうと考える。LBC法で出血性背景が軽減されることは、既に報告がなされている^{4,10)}。本研究においてもLBC法では赤血球が軽度に溶血するために背景の明度が上昇し、細胞の詳細な観察が可能であった。このことは、擦過時に出血することが多い口腔癌の細胞診においてLBC法の有用性は高いと考えられる。

LBC法は、細胞を直接固定液に懸濁するため細胞を乾燥させる必要のあるギムザ染色には不適

である。血球の観察に優れるギムザ染色の必要な悪性リンパ腫等の血液疾患を疑う場合には直接塗抹法を選択する必要がある。臨床診断等の事前情報を臨床医と共有することが重要であると考えられる。また、血液疾患では遺伝子異常がよく知られているため、ギムザ染色と併用してLBC法を行い同時に遺伝子検索も行うことは診断上極めて有用である。

LBC法による遺伝子の保存性に関する報告では、培養細胞を用いてDNAとRNAの検出が可能であると報告されている¹¹⁾。本研究においてもLBC法からRNAの検出が可能であった。しかし、増幅長が長くなるとやや検出感度が悪くなる傾向がみられた。対策としてプライマーを設計する際に増幅長を短く設計を行うことも一案である。今回用いた方法でWestern blot法を行うことによりタンパク質を検出することで、LBC法の新たな可能性が示唆されたが、タンパク質の検出に差がみられた。これは、LBC法が細胞の採取量に依存するために生じたものと考えられる。定量的な解析を行うための方法を今後検討していく必要がある。

結 語

口腔疾患におけるLBC法は、子宮癌等と同様に検体の精度管理や、細胞観察の障害となる出血等の問題を軽減できる優れた検査方法であると考えられる。さらに本研究で用いたMDU変法は、他のLBC法と比較しても煩雑な標本作製を簡略化し経費を最小限に抑えることができた。またRNAやタンパク質の保存性も良く、遺伝子異常に基づく疾患などの補助的診断のためにLBC法を取り入れることは非常に有用であると考えられた。今後はさらに多くの症例でLBC法を用いた分子生物学的な診断について検討していく予定である。

本研究の一部は2009年度松本歯科大学推進研究費の補助を受けて行った。また、本研究は松本歯科大学倫理委員会の承認を受けて行った。

文 献

- 1) 松浦雄介, 川越俊典, 土岐尚之, 蜂須賀 徹, 柏村正道 (2009) 日本における子宮頸がん検診の現状と課題. 産業医大誌 **31**: 181-93.
- 2) Sodom D and Nayar R (2004) The Bethesda system for reporting cervical cytology Second ED, Springer, New York.
- 3) 「子宮がん検診とHPV」に関する検討委員会 (2009) 子宮がん検診とヒトパピローマウイルス Questions & Answers 集, 5-8, 18-23. 日本細胞診断学推進協会, 東京.
- 4) 黒川哲司, 吉田好雄, 八木原亮, 福田美佳, 川原和美, 森 正樹, 今村好章, 福野直孝, 紙谷尚之, 小辻文和 (2005) 子宮内膜細胞診に保存液を使用した液状検体処理導入の試み. 日臨細胞誌 **44**: 6-10.
- 5) 赤松 節, 姫路由香里, 長澤優子, 山田美弥子, 板垣由香里, 筑後千得子, 丸岡 央, 児玉省二 (2005) 子宮がん検診標本の適否状況-Thinlayer法と従来法の比較-. 日臨細胞誌 **44**: 63-8.
- 6) 丹後正紘, 金谷太郎, 橋本 茂, 前川信政, 浮田俊彦, 小山 信, 丘村 誠, 井上正樹 (2008) 子宮頸がん検診におけるHPV検査の導入とその有用性. 日臨細胞誌 **47**: 1-6.
- 7) 佐藤一道, 田中陽一, 竜崎崇仁, 内山智博, 片倉 朗, 宜保一夫, 才藤純一, 伊川裕明, 市島文裕, 齋藤寛一, 山科光正, 野口沙希, 齋藤朋愛, 吉田恭子, 渡辺伸也, 蔵元千夏, 外木守雄, 山根源之 (2009) 千葉県市川市における口腔がん早期発見システム構築の試み. 歯科学報 **109**: 165-70.
- 8) Omar K, Mina D, Alexandra S, Andrew B, Andrew T and Philip S (2006) Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. Oral Oncology **42**: 810-8.
- 9) 手塚文明, 秀城浩司, 及川洋恵, 鈴鹿 邁, 伊藤圭子, 東岩井 久 (1994) 子宮頸部から採取される細胞数とスライド標本に塗抹される細胞数. 日臨細胞誌 **33**: 463-7.
- 10) 野坂大喜, 水戸郁子, 奥沢悦子, 鷺谷清忠, 三浦富智, 方山揚誠, 佐藤達資 (2009) 乳腺細胞診におけるLBCの評価. 弘前大保健紀 **8**: 73-81.
- 11) 野坂大喜, 甲賀洋光, 奥沢悦子, 鷺谷清忠, 三浦富智, 中野 学, 方山揚誠, 佐藤達資 (2009) 婦人科液状細胞診におけるReverse dot bolt in situ hybridization法を用いたHuman papillomavirus検出. 弘前大保健紀 **8**: 83-91.