

尿細胞診における標本作製法による 評価の差異についての検討

関田 信之¹, 下境 博文³, 西川 里佳², 佐藤 広明¹

河野 弘圭¹, 藤村 正亮¹, 三上 和男¹

¹千葉県済生会習志野病院泌尿器科, ²千葉大学医学部附属病院泌尿器科

³千葉県済生会習志野病院病理検査

COMPARISON OF THE CONVENTIONAL CENTRIFUGED AND FILTRATED PREPARATIONS IN URINE CYTOLOGY

Nobuyuki SEKITA¹, Hirofumi SHIMOSAKAI³, Rika NISHIKAWA², Hiroaki SATO¹,

Hiroyoshi KOUNO¹, Masaaki FUJIMURA¹ and Kazuo MIKAMI¹

¹The Department of Urology, Chibaken Saiseikai Narashino Hospital

²The Department of Urology, Graduate School of Medicine, Chiba University

³The Division of Pathology, Chibaken Saiseikai Narashino Hospital

The urine cytology test is one of the most important tools for the diagnosis of malignant urinary tract tumors. This test is also of great value for predicting malignancy. However, the sensitivity of this test is not high enough to screen for malignant cells. In our laboratory, we were able to attain a high sensitivity of urine cytology tests after changing the preparation method of urine samples. The differences in the cytodiagnosis between the two methods are discussed here. From January 2012 to June 2013, 2,031 urine samples were prepared using the conventional centrifuge method (C method); and from September 2013 to March 2015, 2,453 urine samples were prepared using the filtration method (F method) for the cytology test. When the samples included in category 4 or 5, were defined as cytological positive, the sensitivities of this test with samples prepared using the F method were significantly high compared with samples prepared using the C method (72% vs 28%, $p < 0.001$). The number of cells on the glass slides prepared by the F method was significantly higher than that of the samples prepared by the C method ($p < 0.001$). After introduction of the F method, the number of false negative cases was decreased in the urine cytology test because a larger number of cells was seen and easily detected as atypical or malignant epithelial cells. Therefore, this method has a higher sensitivity than the conventional C method as the sensitivity of urine cytology tests relies partially on the number of cells visualized in the prepared samples.

(Hinyokika Kiyo 62: 111-116, 2016)

Key words: Urine cytology, preparation, Filtration method, Sensitivity

緒 言

細胞診検査において、尿細胞診は婦人科細胞診について検体数が多く、泌尿器科診療において重要な役割を担っている。特に尿路上皮癌の診断に際しては、腹部超音波検査・膀胱鏡検査とならび不可欠な検査ツールである。腹部超音波検査や膀胱鏡検査は臨床医自身が施行する機会が多く、所見・結果についての理解が得られやすい。しかし、われわれ臨床医は細胞診標本作製に直接たずさわることはなく、提出された検体がどのように処理され、標本作製され、細胞判定されているのかを知る機会は乏しい。そのことは、他の臨床検査所見と細胞診判定の乖離を経験した際、理解に苦慮する一因となるものと考えられる。また、尿細胞診は感度が30~50%程度と高くないため^{1,2)}、単独での尿路上皮癌のスクリーニング検査としての有用性に

は限界があると考えられている。今回われわれは、尿細胞診の標本作製法を変更することにより、高い感度をえることができた。現在行われている複数の尿細胞診標本作製法の特徴を言及するとともに、当院で経験した標本作製法の違いによる細胞診評価の差異について検討した。

対 象 と 方 法

2012年1月~2013年6月の期間に遠心法 (C method) にて標本作製を行った尿細胞診検体 2,031件 (症例数 1,812例) と、2013年9月から2015年3月までにフィルター法 (F method) で標本作製を行った尿細胞診検体 2,453件 (症例数 2,184例) を対象とした。細胞診の評価分類は class 分類 (I~V) の5段階を用いた。細胞判定は固定した2名の細胞検査士および、単独の細胞診専門医が通常業務として行った評価を用いた。

Class III 以上と評価されたが疾患を認めなかった症例で、その後の観察期間が6カ月未満であった症例は除外した。

全検体の細胞診評価を2種の標本作製法の間で比較し、悪性診断に対する尿細胞診の感度・特異度を算出した。また、悪性症例における細胞診評価を用い、異型度別 (HG: high grade と LG: low grade) に感度を比較した。標本作製法の比較は χ^2 検定にて行った。

また、遠心法とフィルター法における標本上の細胞数を調べるために、内視鏡的に切除した膀胱腫瘍の一切片を20 mlの生理食塩水に入れ、細胞浮遊液を作製した。6症例分の浮遊液を用い、前出の2種類の作製法で標本作製し同一面積あたりの標本上の上皮細胞数を比較した。

標本作製法

遠心法：採取した尿をよく攪拌し、10 mlを3,000回転で5分間遠心。沈渣全量を塗抹し、脱落する細胞を少なくする目的で固定液をスプレー噴霧し乾燥させた後、papanicolaou 染色を行った。

フィルター法：フィルカップスーパー® (タイホー工業、東京) を用い、採取した尿全量を水洗により吸引濾過した。細胞の付着したフィルターをスライドガラスにのせ、アルコール固定後 papanicolaou 染色を行った。

結 果

対象検体が提出された症例の背景を Table 1 に示す。標本作製法別の症例背景に有意差はなかった。全検体に対する細胞診評価を Fig. 1 に示す。フィルター法では III, V と評価される症例の比率が遠心法に比べ高かったが、分布に有意差はなかった ($p = 0.412$)。Class III 以上を陽性とした場合には、遠心法/フィルター法の感度は52%/86%、特異度は99%/

Table 1. Characteristics of all cases

	Centrifuge method (C method)	Filtration method (F method)	p- value
Total number of the samples	2,031	2,453	—
Median age (range) (years)	74 (42–87)	75 (28–93)	n.s.
Malignant case	92	95	
Bladder carcinoma	76	74	
No recurrent cases	53	53	n.s.
Recurrent cases	23	21	
Pelvis/Ureter carcinoma	16	21	
Histological type			
Urothelial carcinoma	89	90	
Low grade	36	31	n.s.
High grade	53	59	
Squamous cell carcinoma	2	2	
Adenocarcinoma	1	3	
Clinical stage			
0	30	34	
1	35	32	n.s.
2	11	13	
3	10	11	
4	6	5	

90%であった。フィルター法において、感度は有意に高かった ($p < 0.001$) が特異度は有意に低下した ($p < 0.001$)。Class IV, V を陽性と評価すると、遠心法/フィルター法の感度は28%/72%とフィルター法で有意に高くなり ($p < 0.001$)、特異度は99%/99%であった。

悪性症例に対して提出された細胞診検体の評価を Fig. 2 に示す。class III 以上を陽性とする遠心法/フィルター法での感度は、high grade 症例では72%/95%、low grade 症例では20%/72%であった。Class IV 以上を陽性とした場合の遠心法/フィルター法での感度は、high grade 症例では37%/85%、low grade 症

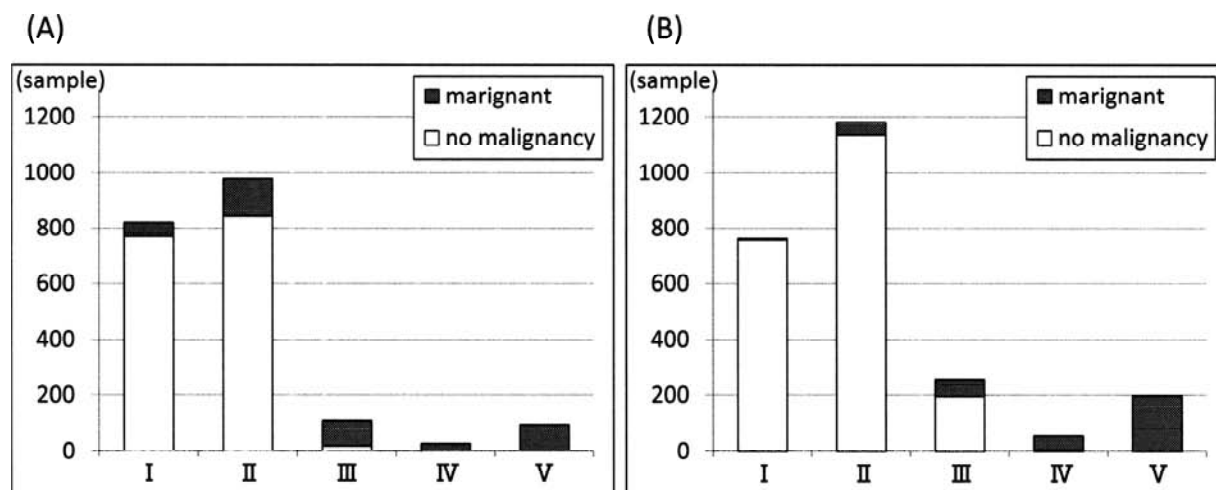


Fig. 1. Cytodiagnosis of total cases. Samples are prepared using the C method (A) and the F method (B).

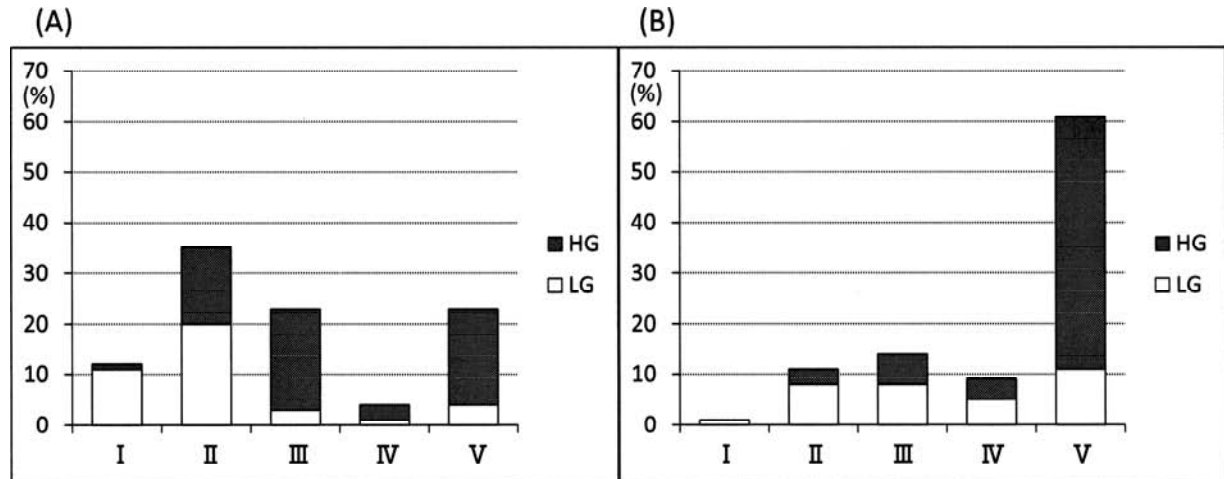


Fig. 2. Cytodiagnosis of malignant cases. Samples are prepared using the C method (A) and the F method (B). HG: high grade urothelial carcinoma, LG: low grade urothelial carcinoma.

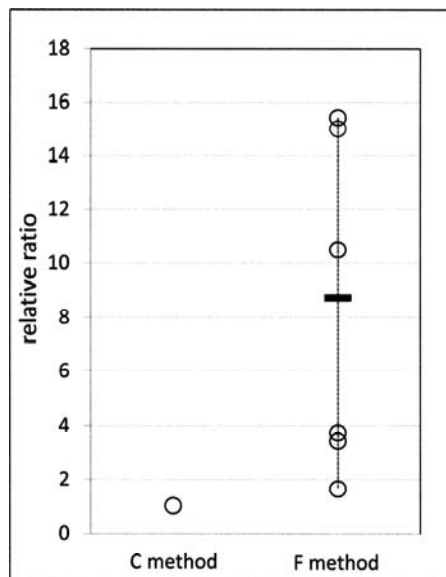


Fig. 3. Ratio of the number of the cells on the prepared glasses. Black bar is the average ratio.

例では12%/48%であった。いずれにおいてもフィルター法での感度が有意に高かった ($p < 0.001$)。

6例の悪性腫瘍症例から得られた細胞浮遊液を用いた標本上の細胞数の比較では、フィルター法で有意に多く ($p < 0.001$)、遠心法に比べ平均8.4倍の観察細胞数であった (Fig. 3, 4)。

考 察

尿細胞診標本作製に関して、従来から行われている遠心法は、標本の作製費用は安価であるが、作製の過程で50~80%程度の細胞が脱落してしまうとされ^{3,4)}、標本の判定には不利であった。そこで、標本上の細胞数を増やす工夫として、処理する検体量を増やしたり、塗抹した細胞が剥離しにくいようスプレーで固定

を行ったり、特殊なスライドガラスを使用したりしてきた。また、遠心後保存液を添加し再度遠心を行う2回遠心法、遠心の際に直接スライドガラスに細胞を付着させるサイトスピン法、本検討で施行したフィルター法でろ過することにより細胞収集するフィルター法など、標本作製法にも工夫がなされてきた。さらに最近では、液状検体細胞診 (liquid based cytology: LBC) が婦人科細胞診を中心に有用性が報告され⁵⁾、普及しつつある。尿細胞診においても効率的に細胞収集が可能であり、悪性細胞の検出率の向上や診断精度を高めるための有用な方法として期待されている^{6,7)}。LBCは細胞の重積が少ない均一な標本が作製でき、現時点で最も推奨される標本作製法であり、米国ではLBC標本での検討が基本となっている。しかし、導入および標本作製にかかる費用が高く、すべての施設で導入することは困難である。本邦の保険診療において、LBC処理で標本作製した場合には、症例は限定されるがLBC加算 (85点) が認められるようになった (Table 2)。今後ランニングコストが低下すれば普及していく可能性が高い標本作製法であると思われる。代表的な標本作製法を Fig. 5 に、またそれらの特徴を Table 2 に示した^{3,8,9)}。

今回は遠心法とフィルター法で比較を行い検討した。class IV以上を陽性とした場合、遠心法では尿路上皮癌の診断に対する感度は28%であり、単独のスクリーニング検査としては信頼性の高い検査とはいえなかった。フィルター法に変更後は、感度は72%と有意に上昇した。LBC法による尿細胞診の感度は21~80%と報告されている¹⁰⁾。ばらつきは多いが平均58%とされ、今回のフィルター法での感度はLBC法と比較し遜色のない結果であった。特に生命予後にかかわる high grade 腫瘍に関しては、95%の症例で class III 以上の評価が得られ、悪性症例の見落としを少な

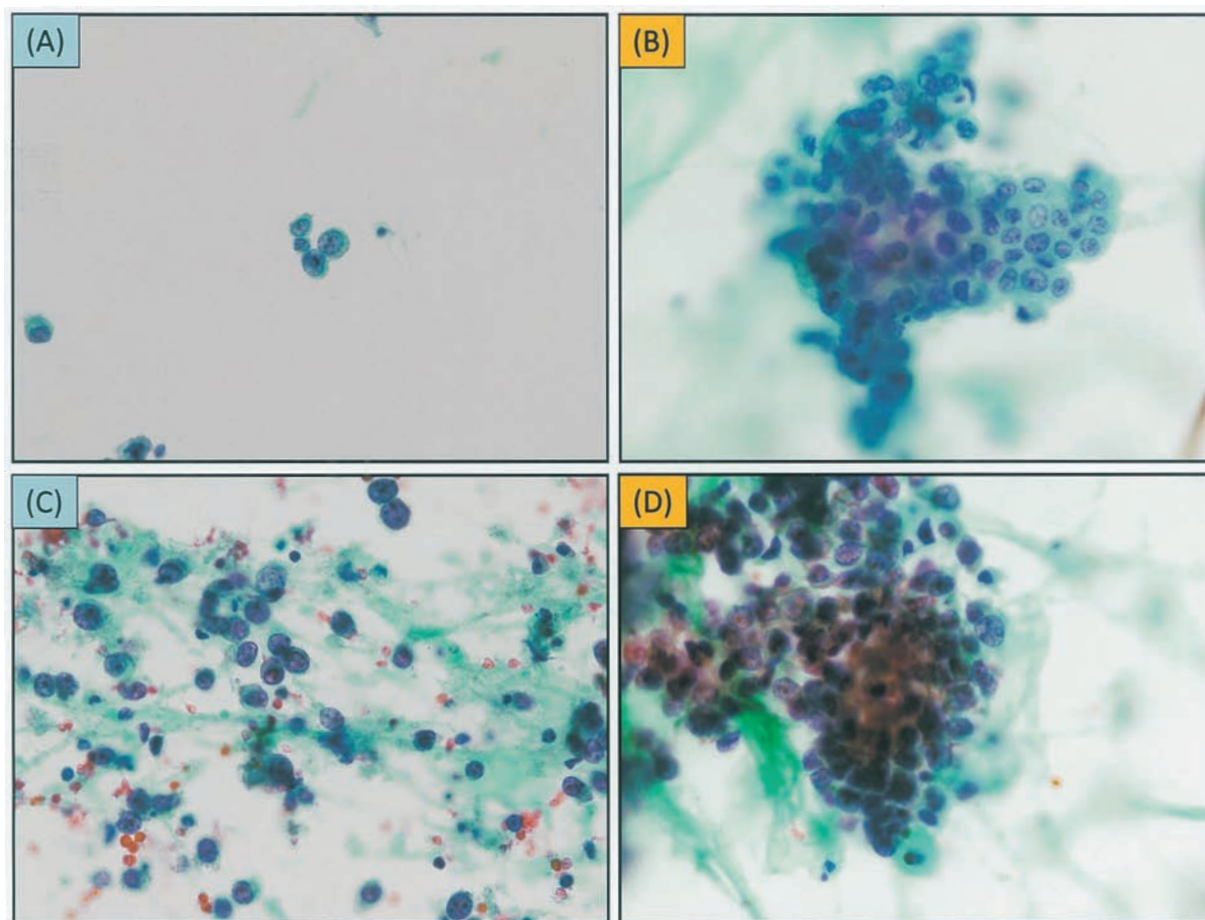


Fig. 4. Features of the malignant cells (papanicolaou stain, $\times 40$). Cases are low grade urothelial carcinoma (A, B) and high grade urothelial carcinoma (C, D). Samples are prepared using the C method (A, C) and the F method (B, D).

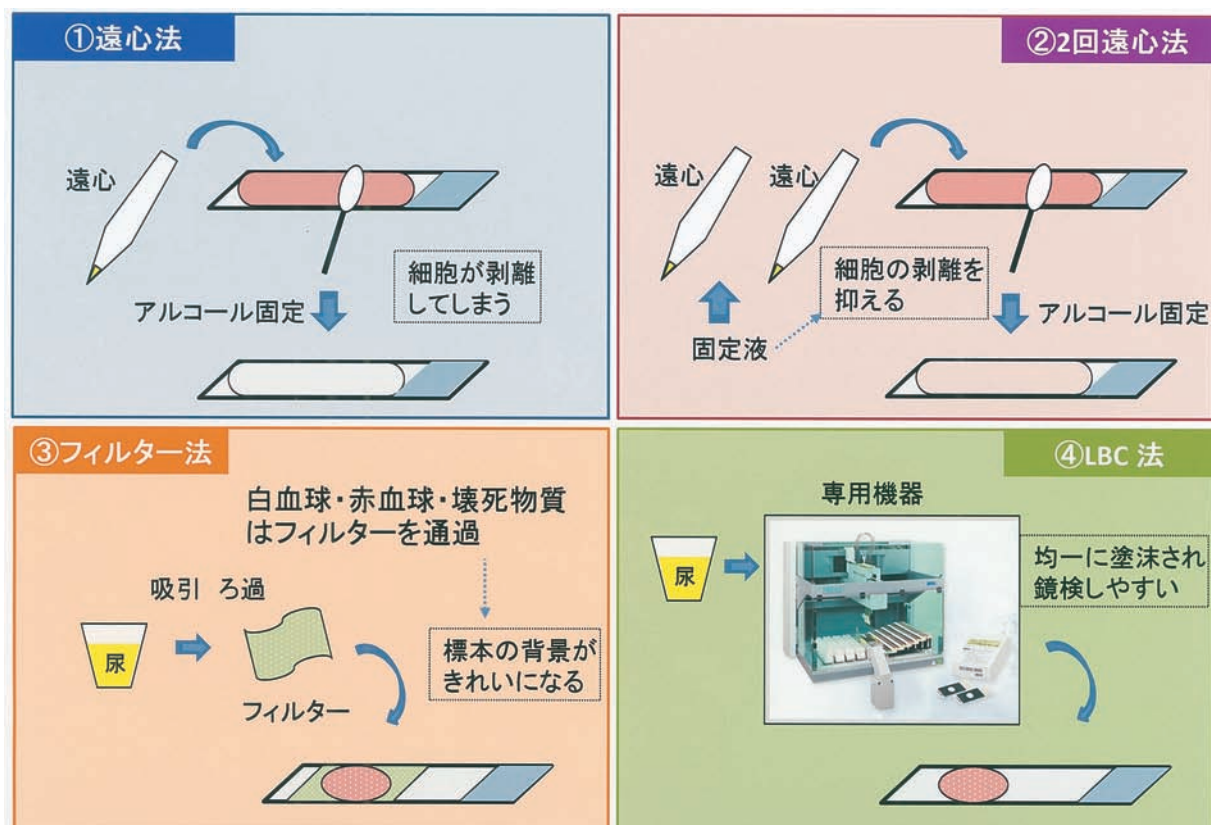


Fig.5. Four methods of urine preparation for the cytology test.

Table 2. Characteristics of preparation methods for the urine cytology

標本作製法	標本上の細胞数		鏡検範囲		標本の染色性		標本作製費 (円/枚)	診療報酬 (加算) (点)	コメント	
遠心法 (C method)	少	×	大	×	並	△	低 (80)	○	190	粘調尿に使用可能
2回遠心法	中	△	大	×	濃染	△	低 (60)	○	190	
フィルター法 (F method)	多	○	小	○	良	○	中 (210)	△	190	鏡検時にフィルター孔が気になる
LBC 法	多	○	小	○	良	○	高 (300-740)	×	190 (85) ^注	検体保存が可能

LBC: Liquid based cytology.

注: 過去に穿刺し又は採取し, 固定保存液に回収した検体から標本作製して診断を行った場合には, 液体化検体細胞診加算として85点を所定点数に加算する。

くできた。正確な評価が得られる理由の1つとして、集細胞数の増加が挙げられる。遠心法は細胞を塗抹しただけのスライドガラスを染色するため、染色過程で多数の上皮細胞が脱落してしまうが、フィルター法は陰圧をかけて吸引することで細胞がフィルターに吸着し、脱落しにくくなると推察される。実際、フィルター法は単位面積当たりに塗抹される細胞数が多く、検鏡に有利であったと考えられた。一方、フィルター法に変更後は class III と判定される症例の割合が全体の10%を超えた。Class III に非癌症例が多く含まれる結果となり、検査の特異度は遠心法と比較し低下した。Class III 以上と評価された非癌症例の58%は尿路結石症であった。結石が存在すると、物理的な刺激により尿路上皮が剥離され、通常は自然尿中には出現しない尿路上皮の基底部の細胞が標本中に認められる。この細胞は低異型度尿路上皮癌との鑑別が難しい。また、標本上の細胞数が多いことは悪性を疑う所見の1つとされている。フィルター法により全体の集細胞数が増加したことで、細胞数の多さが目立ち過剰診断となったものと推察される。細胞診検査提出の際には、臨床情報を付記する必要性を実感した。また、標本作製法が異なる場合には、class III という同じ評価でも、悪性頻度が異なるため注意が必要となる。臨床的に同様に対応すると、過剰診断・過剰検査に陥りやすいため、検査室側には臨床情報を加味したコメント記載が望まれる。

今回導入したフィルター法は原理が単純で、10 μ m の孔があいたフィルターを用い検体をろ過することにより尿中の上皮細胞を確保する。上皮細胞が、長径6~8 μ m の血球成分よりわずかに大きいことを利用している。完全用手法であり、特別な機器を必要としないことから、機器設置の場所を必要とせず、検査人員を増やすことなく対応可能である。また、工程数が少ないこともあり、作製者による標本の質の差が少ない良好な標本が作製可能である。フィルターによる集細胞数はLBCに劣ることはなく⁸⁾、標本を評価するだけの尿細胞診検体に対しては、フィルター法で十分評

価可能と考える。しかしLBCには、検体の保存ができるため追加検査が可能という特徴がある。婦人科領域では、細胞診結果でHPV検査が追加されるが、保存検体から検査が可能であり有用性が高い。泌尿器科でも、免疫染色やFISHなど追加検査を行う際には同一検体で行える利点がある。

一方、極端な膿尿・血尿・尿路変向後の採取尿といった粘調度の高い検体に対しては、フィルター法では目詰まりをおこし、LBCでは細胞を効率よく付着させられないためどちらも不向きである。したがってLBCやフィルター法はすべての検体に対して有用というわけではなく、検体の性状により、検体処理方法を選択することが必要となる。

集細胞数を増やすために導入したフィルター法により、尿細胞診の悪性疾患に対する感度は上昇した。癌細胞が大量に剥離する症例は検体処理によらず診断は可能と考えられるが、スクリーニング要素の高い検査として利用する場合には、集細胞数に比例して診断率が向上する可能性がある。そのため、スクリーニング検査の多い施設では、フィルター法やLBC法といった集細胞に重点をおいた標本作製が望まれる。

今回の検討から、従来の報告で尿細胞診の感度が低いとされる原因として、標本作製法が大きく関与している可能性が考えられた。自施設での細胞診検体処理・作製法を知り、細胞診精度を確認しておくことが重要である。また、より良い標本作製のためには、検査室との連携が必要と思われた。

文 献

- 1) Raab SS, Slagel DD, Jensen CS, et al.: Low-grade transitional cell carcinoma of the urinary bladder: application of select cytologic criteria to improve accuracy. *Mod Pathol* **9**: 225-232, 1996
- 2) Mishriki SF, Aboumarzouk O, Vint R, et al.: Routine urine cytology has no role in hematuria investigations. *J Urol* **189**: 1255-1258, 2013
- 3) 細胞診標本作製マニュアル (泌尿器), 細胞検査士会. 第1版, 2004

Table 2. Characteristics of preparation methods for the urine cytology

標本作製法	標本上の細胞数		鏡検範囲		標本の染色性		標本作製費 (円/枚)	診療報酬 (加算) (点)	コメント	
遠心法 (C method)	少	×	大	×	並	△	低 (80)	○	190	粘調尿に使用可能
2回遠心法	中	△	大	×	濃染	△	低 (60)	○	190	
フィルター法 (F method)	多	○	小	○	良	○	中 (210)	△	190	鏡検時にフィルター孔が気になる
LBC 法	多	○	小	○	良	○	高 (300-740)	×	190 (85) ^注	検体保存が可能

LBC: Liquid based cytology.

注: 過去に穿刺し又は採取し, 固定保存液に回収した検体から標本作製して診断を行った場合には, 液体化検体細胞診加算として85点を所定点数に加算する。

くできた。正確な評価が得られる理由の1つとして、集細胞数の増加が挙げられる。遠心法は細胞を塗抹しただけのスライドガラスを染色するため、染色過程で多数の上皮細胞が脱落してしまうが、フィルター法は陰圧をかけて吸引することで細胞がフィルターに吸着し、脱落しにくくなると推察される。実際、フィルター法は単位面積当たりに塗抹される細胞数が多く、検鏡に有利であったと考えられた。一方、フィルター法に変更後は class III と判定される症例の割合が全体の10%を超えた。Class III に非癌症例が多く含まれる結果となり、検査の特異度は遠心法と比較し低下した。Class III 以上と評価された非癌症例の58%は尿路結石症であった。結石が存在すると、物理的な刺激により尿路上皮が剥離され、通常は自然尿中には出現しない尿路上皮の基底部の細胞が標本中に認められる。この細胞は低異型度尿路上皮癌との鑑別が難しい。また、標本上の細胞数が多いことは悪性を疑う所見の1つとされている。フィルター法により全体の集細胞数が増加したことで、細胞数の多さが目立ち過剰診断となったものと推察される。細胞診検査提出の際には、臨床情報を付記する必要性を実感した。また、標本作製法が異なる場合には、class III という同じ評価でも、悪性頻度が異なるため注意が必要となる。臨床的に同様に対応すると、過剰診断・過剰検査に陥りやすいため、検査室側には臨床情報を加味したコメント記載が望まれる。

今回導入したフィルター法は原理が単純で、10 μ m の孔があいたフィルターを用い検体をろ過することにより尿中の上皮細胞を確保する。上皮細胞が、長径6~8 μ m の血球成分よりわずかに大きいことを利用している。完全用手法であり、特別な機器を必要としないことから、機器設置の場所を必要とせず、検査人員を増やすことなく対応可能である。また、工程数が少ないこともあり、作製者による標本の質の差が少ない良好な標本が作製可能である。フィルターによる集細胞数はLBCに劣ることはなく⁸⁾、標本を評価するだけの尿細胞診検体に対しては、フィルター法で十分評

価可能と考える。しかしLBCには、検体の保存ができるため追加検査が可能という特徴がある。婦人科領域では、細胞診結果でHPV検査が追加されるが、保存検体から検査が可能であり有用性が高い。泌尿器科でも、免疫染色やFISHなど追加検査を行う際には同一検体で行える利点がある。

一方、極端な膿尿・血尿・尿路変向後の採取尿といった粘調度の高い検体に対しては、フィルター法では目詰まりをおこし、LBCでは細胞を効率よく付着させられないためどちらも不向きである。したがってLBCやフィルター法はすべての検体に対して有用というわけではなく、検体の性状により、検体処理方法を選択することが必要となる。

集細胞数を増やすために導入したフィルター法により、尿細胞診の悪性疾患に対する感度は上昇した。癌細胞が大量に剥離する症例は検体処理によらず診断は可能と考えられるが、スクリーニング要素の高い検査として利用する場合には、集細胞数に比例して診断率が向上する可能性がある。そのため、スクリーニング検査の多い施設では、フィルター法やLBC法といった集細胞に重点をおいた標本作製が望まれる。

今回の検討から、従来の報告で尿細胞診の感度が低いとされる原因として、標本作製法が大きく関与している可能性が考えられた。自施設での細胞診検体処理・作製法を知り、細胞診精度を確認しておくことが重要である。また、より良い標本作製のためには、検査室との連携が必要と思われた。

文 献

- 1) Raab SS, Slagel DD, Jensen CS, et al.: Low-grade transitional cell carcinoma of the urinary bladder: application of select cytologic criteria to improve accuracy. *Mod Pathol* **9**: 225-232, 1996
- 2) Mishriki SF, Aboumarzouk O, Vint R, et al.: Routine urine cytology has no role in hematuria investigations. *J Urol* **189**: 1255-1258, 2013
- 3) 細胞診標本作製マニュアル (泌尿器), 細胞検査士会. 第1版, 2004

- 4) 小山芳徳, 石田康生 : 症例から学ぶ 細胞診のポイント 3) 泌尿器. *Medical Technology* **42** : 686-692, 2014
- 5) 平井康夫, 古田則行, 荒井祐司, ほか : 子宮頸部病変検出における液状化検体細胞診 (LBC) ThinPrep の精度と有用性評価のための前方視的検討. *日臨細胞会誌* **49** : 237-241, 2010
- 6) Laucirica R, Bentz JS, Souers RJ, et al. : Do liquid-based preparations of urinary cytology perform differently than classically prepared cases? Observations from the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Nongynecologic Cytology. *Arch Pathol Lab Med* **134** : 19-22, 2010
- 7) Raistrick J, Shambayati B and Dunsmuir W : Collection fluid helps preservation in voided urine cytology. *Cytopathology* **19** : 111-117, 2008
- 8) 夏目園子, 今井律子, 佐竹立成 : 尿細胞診のフィルター法. *検と技* **36** : 105-108, 2008
- 9) 土田 秀, 中里宜正, 神山晴美, ほか : 液状化細胞診を用いた尿細胞診の検体処理法の検討. *日臨細胞会誌* **52** : 406-410, 2013
- 10) Son SM, Koo JH, Choi SY, et al. : Diagnostic value of liquid-based cytology in urothelial carcinoma diagnosis : a systematic review and meta-analysis. *Korean J Pathol* **46** : 68-74, 2012

(Received on August 3, 2015)

(Accepted on November 8, 2015)