

短 報

細胞診検体における遺伝子検索に必要な腫瘍細胞数について —細胞診標本からの適正判断の目安—

長岡中央総合病院、病理部；臨床検査技師¹⁾、細胞検査士²⁾、認定病理医³⁾、細胞診指導医⁴⁾

大橋 珠紀^{1,2)}、小杉 久良^{1,2)}、五十嵐俊彦^{3,4)}

背景：通常の1項目に対する Polymerase Chain Reactin (以下、PCR) 遺伝子検索に必要な腫瘍細胞数は Formalin-fixed paraffin-embedded (以下、FFPE とする) ブロックにおいては、一般的に約2000個以上 (DNA 量 10 ng) とされているが、細胞診検体において遺伝子検索を実施する場合、腫瘍細胞数の確認が困難な状況にあり、必要数に満たない場合は、「偽陰性」となる可能性があった。そこで、細胞診断用 Papanicolaou (以下、Pap とする) 染色標本上に出現する腫瘍細胞数から、遺伝子検索性検体としての適正判断の目安となる基準を考案することとした。

条件：沈査の1/2量を凍結保存 (-80℃保管)、1/2量を細胞診断用標本作製に使用し、1検体あたり3～4枚の標本作製する。遺伝子検索に必要な腫瘍細胞数はFFPEブロック検体を参考にし、1検体あたり約2000個以上とした。腫瘍細胞が半量ずつ均等に分配されているとして、Pap染色標本1枚あたりに約500枚～700個以上の腫瘍細胞が確認できれば、凍結保存検体中にも同等の腫瘍細胞が存在し、遺伝子検索の検体として適正と判断することが可能であると考えた。

考察：集細胞法による塗抹面積は、1.4 cm角が約2 cm²、長径0.5 cmの円形では約0.2 cm²となり、腫瘍細胞を高倍率 (対物40倍、1視野=0.345 mm²) で観察する際に出現するおおよその数を算出した。また、腫瘍細胞の出現形態 (孤立散在性、集塊) に応じてまとめ、適正判断の目安として、表に示した。その際、集塊の大きさに応じて、標本1枚に対する出現集塊数についても記載した。集塊を構成する腫瘍細胞の数を目安として、図に提示した。

結語：鏡検の際に活用することで遺伝子検索検体の適正の判断が得やすくなると思われる図表を提示した。また遺伝子検索の検体適正判断の目安を設けることで、細胞診検体における遺伝子検索結果の「偽陰性」をできる限り回避することができ、精度管理に役立つことと考える。

キーワード：遺伝子検索、細胞診検体、腫瘍細胞数、偽陰性

細胞数はFFPEブロックにおいては、一般的に約2000個以上 (DNA 量 10 ng) とされており、FFPEブロック (細胞診検査のセルブロックも含む) においては、Hematoxylin Eosin 標本において腫瘍細胞数の確認が可能である (1、2)。

しかし、細胞診検査においては、沈査が少なくセルブロックの作製が困難である場合や良悪性の判断を優先とした細胞診断用の検体では、当院では、沈査の約半量を-80℃の超低温冷凍庫にて保存し、遺伝子検索を実施しており、腫瘍細胞数の確認が困難な状況にあった。そのため、必要な腫瘍細胞数に満たない場合は、遺伝子検索結果が「偽陰性」となる可能性があった。

そこで、凍結保存用検体と同時に作製した細胞診断用 Pap 染色標本上に出現する腫瘍細胞数から、遺伝子検索性検体としての適正判断の目安となる基準を考案することとした。なお、遺伝子検索に必要な腫瘍細胞数はFFPEブロック検体を参考にし、1検体あたり、約2000個以上とする。

条 件

以下の方法で細胞診断用標本作製することとする。

- ①沈査中の腫瘍細胞が均等になるように、スポイト等よく攪拌する。
- ②沈査の1/2量を凍結保存 (-80℃保管)、1/2量を細胞診断用標本作製に使用する。
- ③細胞診断用の標本は、沈査すべてを使用し、1検体あたり3～4枚の標本作製する。
- ④沈査が少量であるため、直接塗抹法は実施せず、集細胞法にて作製すること。

(塗抹範囲は1.4 cm角が長径0.5 cmの円形となる。)

以上の方法で標本作製すると、腫瘍細胞を半量ずつ均等に分配しているとして、Pap染色標本1枚あたり、約500枚～700個以上の腫瘍細胞が確認できれば、凍結保存検体中にも同等の腫瘍細胞が存在し、遺伝子検索の検体として、適正とする。

考 察

塗抹面積は、1.4 cm角が約2 cm²、長径0.5 cmの円形では、約0.2 cm²となり、腫瘍細胞を高倍率 (対物40倍、1視野=0.345 mm²) で観察する際に出現する数を算出した。

背 景

通常の1項目に対するPCR遺伝子検索に必要な腫瘍

まず、塗抹範囲が1.4 cm角の場合、腫瘍細胞の出現形態が孤立散在性で単個の時、1視野毎に1個確認でき、30個程度の腫瘍細胞集塊の時、10視野中に3個程度確認できれば、適正となる。塗抹範囲が長径0.5 cmの円形の場合は、腫瘍細胞の出現形態が単個の時、1視野毎に10個確認でき、30個程度の腫瘍細胞集塊の時、1視野毎に3個程度確認できれば、適正となる。また、両者の塗抹範囲共に、30個程度の腫瘍細胞集塊であれば、1標本上に集塊数20個以上、100個程度の集塊の時1標本上に集塊数5個以上を確認できれば、適正となる。

これらの適正判断の目安を表1にまとめた。また、出現形態が集塊である時、腫瘍細胞数の目安を図1に示した。

なお、FFPEブロックでは、炎症性細胞や壊死性物質は避けることが望ましく、サンプリング組織上の腫瘍割合が、一般的に20%以上であることが必要とされているため、細胞診検体においても、これらの背景が伺える場合は、不適となる可能性があるとして予測される(3)。また、一般的に、がん遺伝子パネル検査に必要なDNA量は10~500 ngとされているが、使用する遺伝子パネルや次世代シーケンシング法機器の種類により異なる(1)。今回の適正判断となる目安はあくまで、1項目の遺伝子検索に適応するものであり、がん遺伝子パネル検査用では複数項目の遺伝子を検索するため、より多量のDNA量が必要となる。よって、これらも踏まえて、細胞診検体を使用した遺伝子検索の適正判断は、必ず、認定病理医等と相談の上、決定することが重要である。

結 語

提示した表1や図1を鏡検の際に活用することで、腫瘍細胞数による遺伝子検索検体の適正の判断が得やすくなると思われる。遺伝子検索の検体適正判断の目安を設けることで、腫瘍細胞数が満たない場合は認定病理医等と相談の上、遺伝子検索を無理に実施せず、細胞診検体における遺伝子検索結果の「偽陰性」をできる限り回避することができるので、精度管理に役立つことと考える。

文 献

1. 日本病理学会ゲノム診療用病理組織検体取扱い規定策定ワーキンググループ作成. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規約. 初版. 一般社団法人日本病理学会; 2018. 8-9頁.
2. 関根郁夫、村谷匡氏、千葉滋、野口恵美子編. がんゲノム医療 結果報告書の読み方と患者への伝え方. 1版. 医学と看護社; 2020. 16頁.
3. 関根郁夫、村谷匡氏、千葉滋、野口恵美子編. がんゲノム医療 結果報告書の読み方と患者への伝え方. 1版. 医学と看護社; 2020. 13頁.

英 文 抄 録

Brief report

Number of Tumor Cells Necessary for Gene Search in Cytology Samples: Guideline for Appropriate Determination from Cytology Specimen

Department of Pathology, Nagaoka Chuo General Hospital; Clinical laboratory technologist,¹⁾ cytotechnologist,²⁾ certified pathologist,³⁾ and cytology advisor⁴⁾ Tamaki Ohashi,^{1,2)} Hisayoshi Kosugi,^{1,2)} Toshihiko Igarashi^{3,4)}

Background : The number of tumor cells required for the normal polymerase chain reaction (PCR) gene search on a single item is generally regarded as about 2000 cells minimum (DNA level: 10 ng) for a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) block. However, there is difficulty confirming the number of tumor cells for gene searches conducted on cytology samples, and there is a possibility of false negative results being obtained if the number is not sufficient. For this reason, the standard number that act as the guideline for appropriate determination of gene search samples was discussed based on the number of tumor cells appearing on the cytology Papanicolaou (Pap) smear specimen.

Conditions : Half the amount of the sediment was stored frozen (stored at -80°C) and the other half was used for the preparation of cytology specimen with three to four specimens prepared from a single sample. The number of tumor cells required for the gene search was set at about 2000 cells minimum from each sample with reference to the FFPE block samples. Assuming that half the number of tumor cells is distributed evenly, if the minimum of about 500 to 700 tumor cells are observed in each Pap smear specimen, the same number of tumor cells was thought to be present in the frozen stored samples and was considered appropriate for use as a gene search sample.

Discussion : The smear area according to the cell concentration was about 2 cm^2 for 1.4 cm squares and about 0.2 cm^2 for a circle with a major axis of 0.5 cm . The tumor cells were observed under high magnification ($\times 40$ objective, 1 visual field = 0.345 mm^2), and the approximate number of cells that appear was counted. In addition, the tumor cells were summarized by the format of appearance (isolated or scattered, agglomeration), and the result was shown in Table as a guideline for appropriate determination. In this summarization, the number of agglomerations appearing in each specimen was also shown based on the size of agglomeration. The number of tumor cells constituting the agglomeration was presented as a guideline in Figure.

Conclusion : Utilization of Table and Figure in microscopy was considered to facilitate the appropriate determi-

nation of gene search samples. Also, the establishment of a guideline for the appropriate determination of gene search samples was thought to help avoid false negative results in the gene search results of cytology samples where possible and is consid-

ered beneficial for precision control.

Key words : Gene search, cytology samples, number of tumor cells, false negative

表1 遺伝子検索に必要な腫瘍細胞数の適正目安

腫瘍細胞形態	塗抹面積	
	1.4 cm 角 (約 2 平方 cm) 	φ 0.5 cm (約 0.2 平方 cm) 
孤立散在性 (単個)	1 個 / 每視野 (対物40倍)	10 個 / 每視野 (対物40倍)
30 個程度の集塊	3 個 / 10 視野 (対物40倍)	3 個 / 每視野 (対物40倍)
	20 個 / 標本 1 枚	
100 個程度の集塊	5 個 / 標本 1 枚	

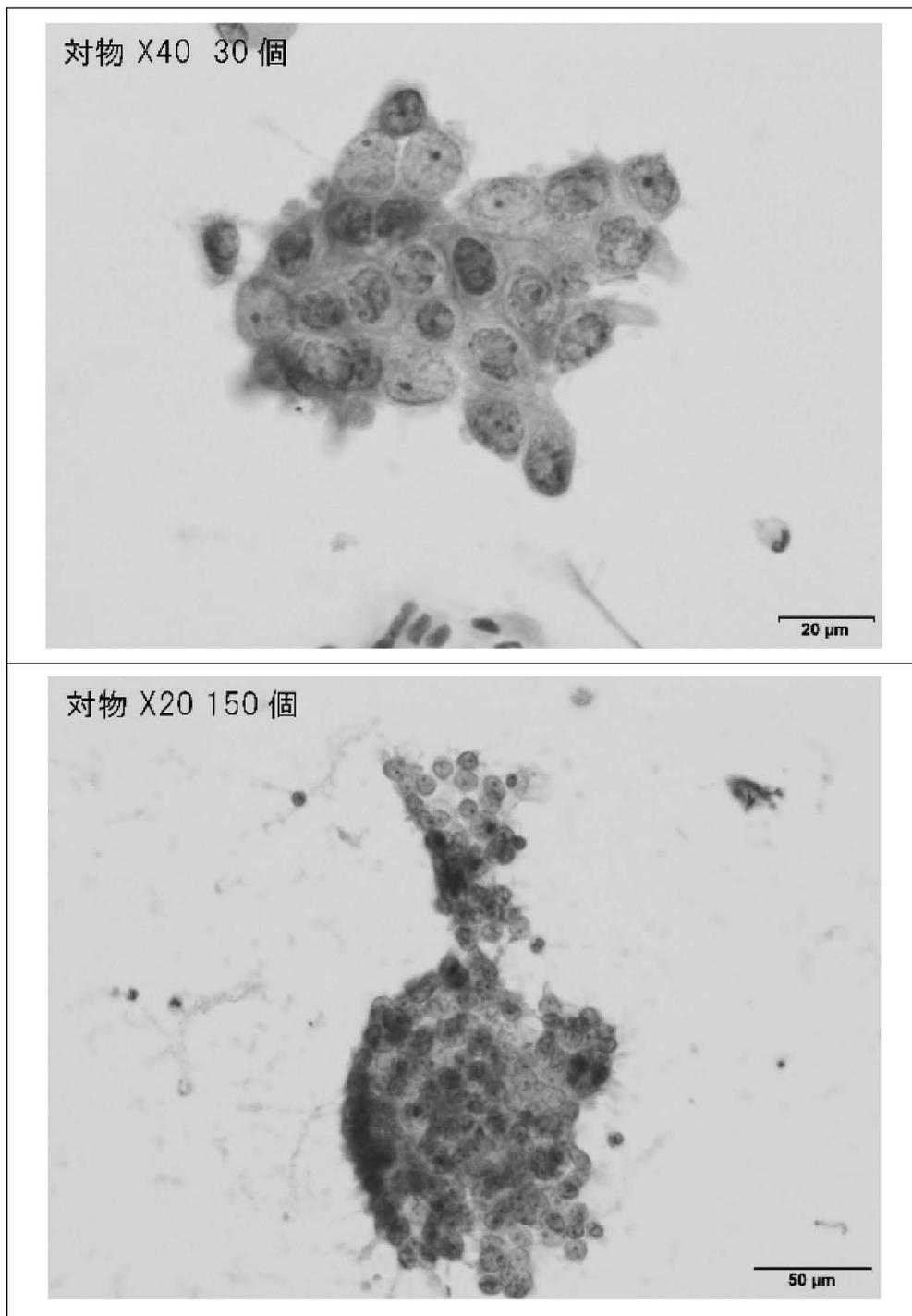


図1 集塊で出現する腫瘍細胞数の目安
(上) 対物40倍における腫瘍細胞 30個程度の集塊
(下) 対物20倍における腫瘍細胞 150個程度の集塊