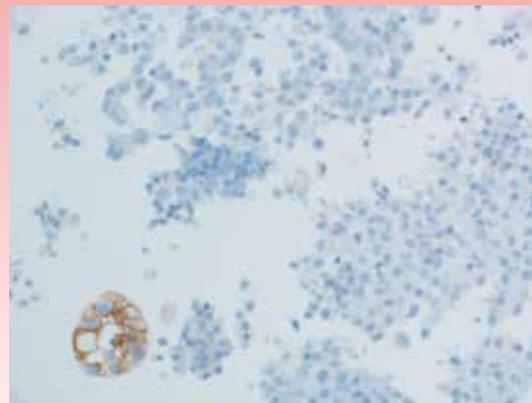
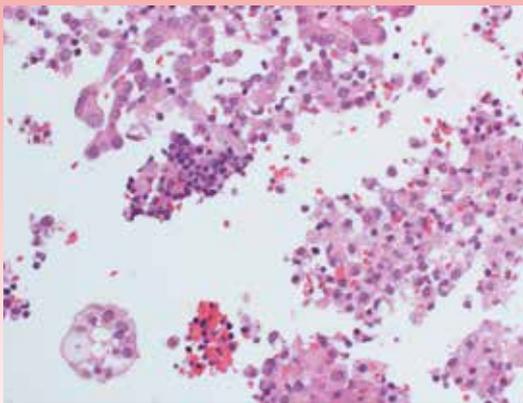
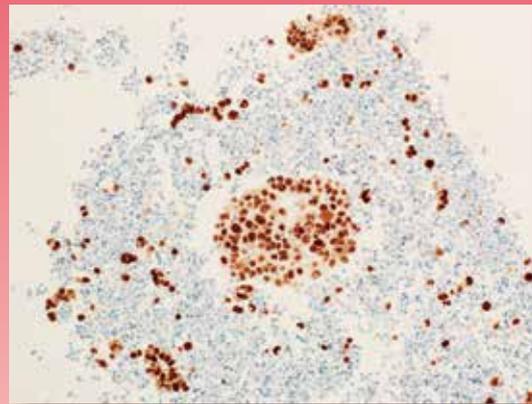
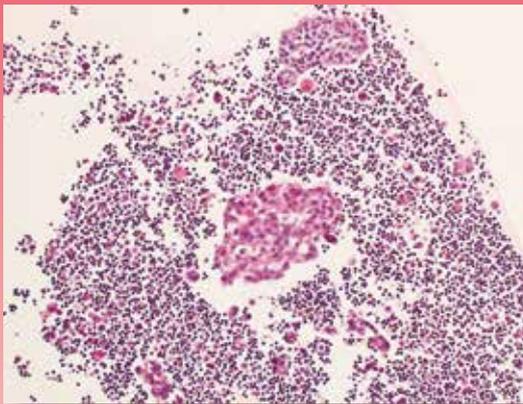


乳癌転移巣細胞診検体受容体検査マニュアル

平成26年度および平成29年度国立病院機構ネットワーク共同研究
「細胞診検体を用いた乳癌薬物療法適応決定のための基礎研究」
(H26-NHOがん一般-02 / H29-NHOがん一般-02) 研究班



はじめに

乳癌では、再発後の薬物療法効果は転移巣のホルモン受容体およびHuman Epidermal Growth Factor Receptor Type 2 (HER2) (以後受容体と記載する) 発現と関連していることが近年報告され、薬物療法適応決定に転移巣の受容体検査も推奨されるようになった。一方、細胞診は、体腔液等の液状検体や生検が難しい部位の検体採取にも使用可能であるため、癌転移巣の診断に有用である。

乳癌細胞診検体を用いた受容体検査の報告はすでに多数あるが、通常の細胞診標本作製方法では、複数枚の安定した標本作製が困難であることが、日常運用する上での問題点であった。研究代表者らは、乳癌細胞診検体を用いた受容体検査方法を確立し、日常業務でも実施している。

そこで、研究代表者が勤務している四国がんセンターで行っている方法が他施設でも日常運用可能であるかどうかを検討するために、国立病院機構の乳癌患者数の多い病院からなる研究班を立ち上げた。研究班は病理医、外科医、臨床検査技師、統計学者から構成された。研究班に参加した施設の評判もよく、班員からこの方法の有用性をアピールした方がよいとの意見があったことから、今回の方法をわかりやすくまとめたマニュアルを作成することにした。

病院の病理検査室に常備していただき、乳癌転移巣細胞診検体の標本作製時と結果判定時に参照していただければ幸いである。ただ、結果判定方法については、標準化されたものはないため、収集した各施設の標本を見直して、現時点で適当と思われる方法を提案した。

平成26年度および平成29年度国立病院機構ネットワーク共同研究
「細胞診検体を用いた乳癌薬物療法適応決定のための基礎研究」
(H26-NHOがん一般-02 / H29-NHOがん一般-02) 研究班

2017年12月

「細胞診検体を用いた乳癌薬物療法適応決定のための基礎研究」班 構成組織

研究代表者	西村 理恵子	四国がんセンター
研究責任者	山城 勝重	北海道がんセンター（研究計画アドバイザー）
	鈴木 博義	仙台医療センター
	村田 有也	東京医療センター
	市原 周	名古屋医療センター
	森 清	大阪医療センター
	倉岡 和矢	呉医療センター・中国がんセンター
	田口 健一	九州がんセンター
	伊東 正博	長崎医療センター
研究協力者	高橋 将人	北海道がんセンター
	平紀 代美	北海道がんセンター
	東 学	北海道がんセンター
	渡辺 隆紀	仙台医療センター
	高橋 真紀	仙台医療センター
	松井 哲	東京医療センター
	沼田 ますみ	東京医療センター
	阿久津 朋子	東京医療センター
	佐藤 康幸	名古屋医療センター
	岡 寄 勲	名古屋医療センター
	小塚 佳代子	名古屋医療センター
	増田 慎三	大阪医療センター（研究計画アドバイザー）
	津田 健治	大阪医療センター
	尾崎 慎治	呉医療センター・中国がんセンター
	西村 俊直	呉医療センター・中国がんセンター
	大西 浩	呉医療センター・中国がんセンター
	吉田 美帆	呉医療センター・中国がんセンター
	徳永 えり子	九州がんセンター
	宮久 禎	九州がんセンター
	小嶋 健太	九州がんセンター
	前田 茂人	長崎医療センター
	佐藤 圭	長崎医療センター
	青儀 健二郎	四国がんセンター
	寺本 典弘	四国がんセンター
	佐藤 正和	四国がんセンター
	山本 珠美	四国がんセンター
	岡本 奈美	四国がんセンター
	山下 夏美	四国がんセンター
研究事務局	近藤 教子	四国がんセンター
	寺阪 千秋	四国がんセンター

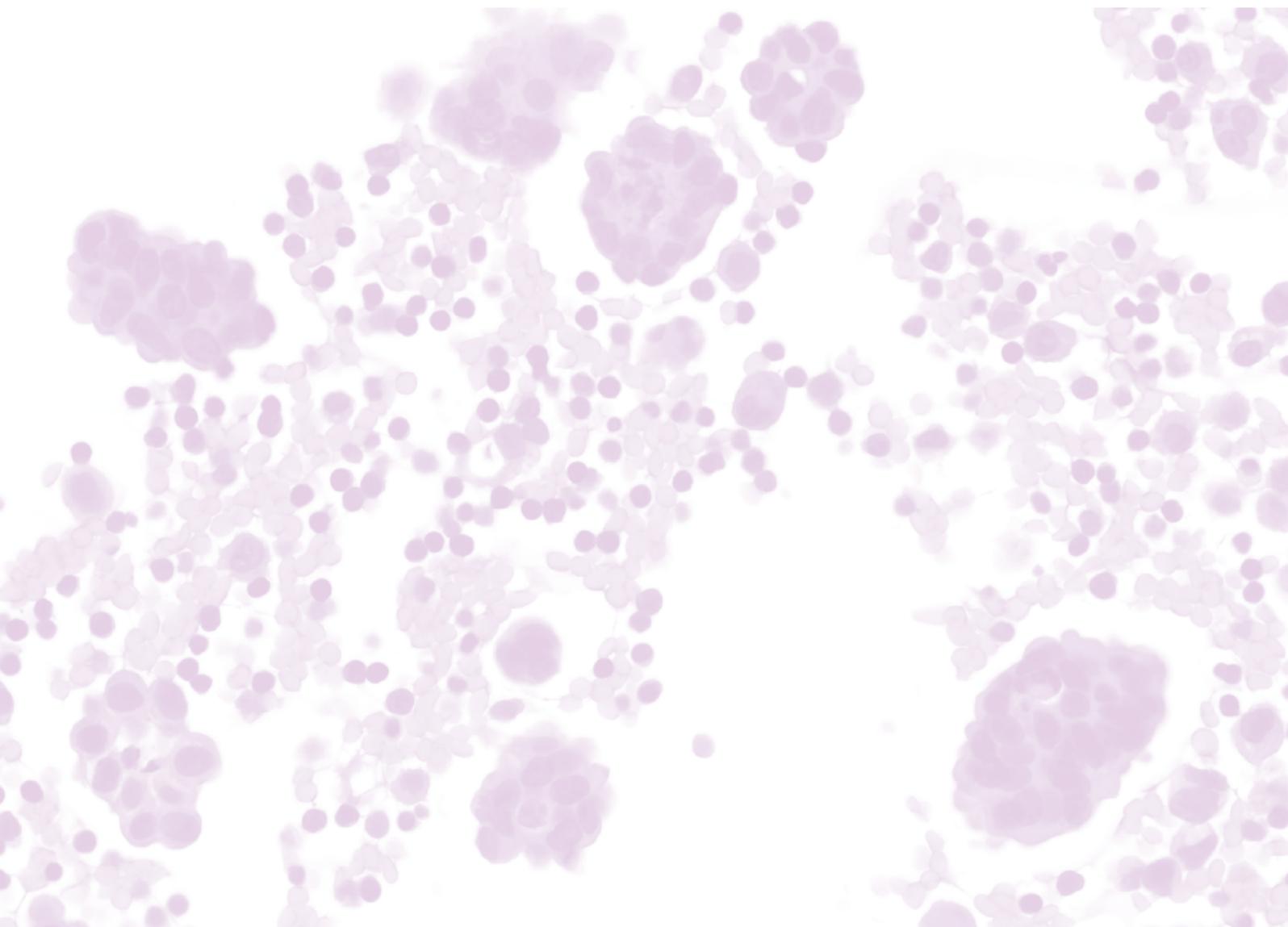
* 班員の所属施設は研究班参加当時のものである。

1. 乳癌転移巣細胞診検体に対する受容体検索の必要性	4
2. 細胞診検体受容体検索方法	5
3. セルブロック法	6
(1) セルブロック法とは	6
(2) アルギン酸ナトリウム法	6
(3) セルブロック作製上の注意点	6
4. 染色方法	6
5. 結果判定方法	8
(1) ホルモン受容体	8
(2) Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2 (HER2)	8
6. 判定例	9
7. 参考文献	16

1. 乳癌転移巣細胞診検体に対する受容体検索の必要性

乳癌では、再発後の薬物療法効果は転移巣の受容体発現と関連していることが近年報告され、薬物療法適応決定に転移巣の受容体検査も推奨されるようになったため^{1, 2)}、転移巣に対する受容体検査が日常診療でも一般的になってきている。

受容体検査には組織検体を用いることが望ましいが、体腔液等の生検が難しい部位への転移巣や、患者の状態により生検が難しい場合でも、細胞診検体であれば採取可能である。そのような場合の対応策として、細胞診検体を用いた受容体検査は有用な手段である。



2. 細胞診検体受容体検索方法

受容体検索には、複数枚の安定した標本作製が必要である。その方法としては、液状化検体細胞診（液状細胞診）法とセルブロック法がある（表）。いずれの方法もホルモン受容体免疫染色^{3, 4)}とHER2遺伝子増幅法⁵⁻⁷⁾については判定可能とされているが、液状細胞診法は、装置購入費用がかかることが多く、消耗品購入費用も高い。セルブロックは組織標本と同様に取り扱うことができることから、院内に病理検査室がある施設では、セルブロック法の方が日常運用に適している。

液状細胞診法には、日常業務におけるHER2判定について問題点がある。液状細胞診法でHER2蛋白免疫染色結果を安定して判定することは不可能であるため^{8, 9)}、全例を遺伝子増幅法で判定する必要がある⁵⁾。その場合、費用と時間がかかるため、日常運用には不適當と思われる。日常業務としては、HER2判定をまず免疫染色で行い、equivocal例に対して遺伝子増幅法を行う方法がよいと思われるが、その場合は、セルブロック法を用いると組織検体と同様の運用が可能である¹⁰⁾。

HER2遺伝子増幅法としては、FISH (fluorescence in situ hybridization)法とDISH (dual in situ hybridization)法があるが、日常検体では非腫瘍細胞の混在が多いため、明視野下で観察できるDISH法が望ましい。

表 液状化検体細胞診法とセルブロック法の比較

	液状化検体細胞診法	セルブロック法
判定可能な検体の割合 ^{注1)}	ほぼ同じ	
組織ホルモン受容体判定との一致率 ^{注1)}	いずれも良好	
組織HER2遺伝子増幅判定との一致率 ^{注1)}	いずれも良好	
HER2蛋白免疫染色結果判定 ^{注2)}	困難	可能
装置購入初期費用	必要なことが多い	不要
消耗品購入費用	高い	安い
追加標本作製	手間がかかる	容易
検体の保存形態	液体	ブロック
固定液内での免疫染色可能な保存期間 ^{注3)}	長い	短い
観察可能な細胞量	多い	やや少ない

注1) 乳癌原発巣組織標本と同部の穿刺検体の検討による³⁻⁷⁾。

注2) 液状化検体細胞診法でもHER2蛋白免疫染色の判定が可能との報告もあるが、多くは偽陽性率が高いと報告されている⁸⁾。四国がんセンターにおける予備検討では、背景染色が強く判定できなかった。

注3) セルブロック法はホルマリン固定として記載している。

3. セルブロック法

(1) セルブロック法とは

細胞検体を何らかの方法で固めてパラフィン等で包埋しておく方法である。半永久的に保存可能で、組織検体と同じように扱うことができる。セルブロック作製方法は各種あるが、四国がんセンターで行っている一般的な方法で、研究班参加施設で行って評判がよかった、アルギン酸ナトリウム法を紹介する。

(2) アルギン酸ナトリウム法

原理：アルギン酸ナトリウムがカルシウムイオン存在下にゲル化することを利用している。

使用試薬：1%アルギン酸ナトリウム（和光純薬）、1M塩化カルシウム（和光純薬）。

*それぞれ50ml作製し、3か月間使用している。

方法（図）：具体的な方法を次ページの図に示す¹¹⁾。

(3) セルブロック作製上の注意点

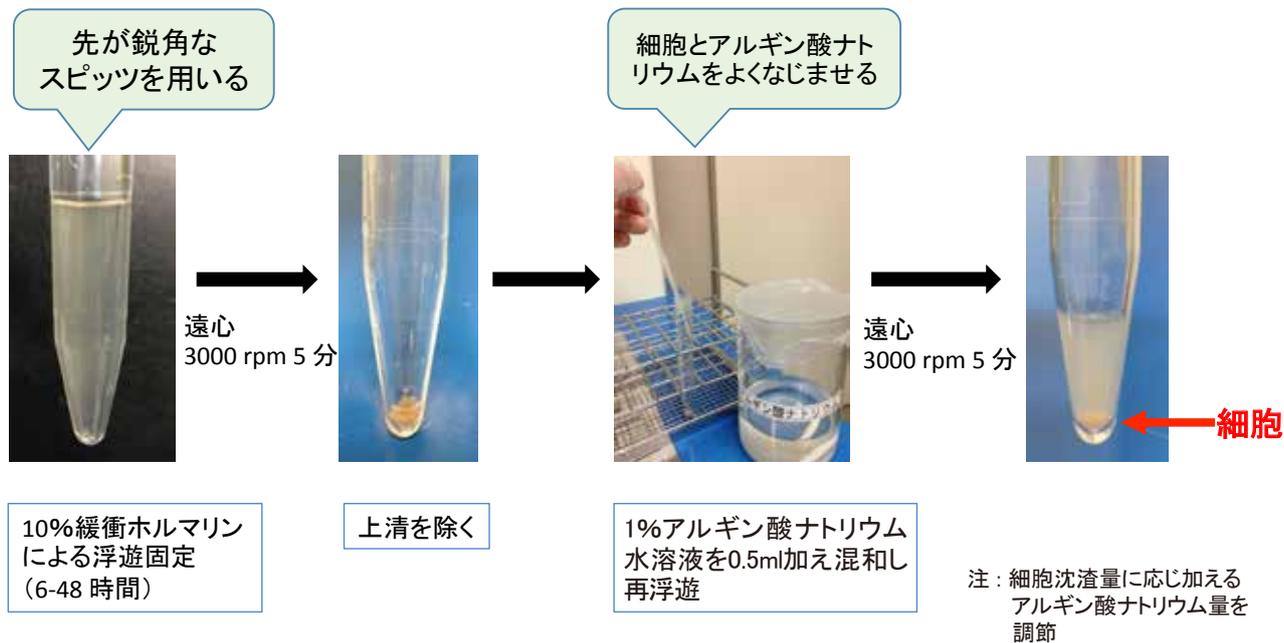
- ① 安定した染色結果を得るためには、固定液の濃度（10%緩衝ホルマリン）と固定時間（6～48時間）を一定に保つことが重要である。
- ② 細胞を高い密度で収集するために、先が鋭角なスピッツを使用するとよい。
- ③ 細胞量が多い場合、アルギン酸ナトリウムを滴下後、アルギン酸ナトリウムと細胞をよくなじませることが大切である。その後遠心し細胞を沈殿させる。ゲルを取り出す際、スピッツの底に細胞が取り残されるのを防ぐことができる。
- ④ 塩化カルシウムを添加後、ゲルが浮かび上がってくるのを待ってピンセットで取り出す。ピンセットでゲルをスピッツ底部から強くはがすとゲルが壊れることがあるためである。
- ⑤ ゲルはホルマリン中では溶解するため、自動包埋装置にかけるまではアルコールで保存する。

4. 染色方法

基本的には、組織標本用の方法で染色できる。研究班では各施設の自動染色装置を用いて、組織標本用のプロトコールで染色したが、いずれも判定可能な染色性が得られた。

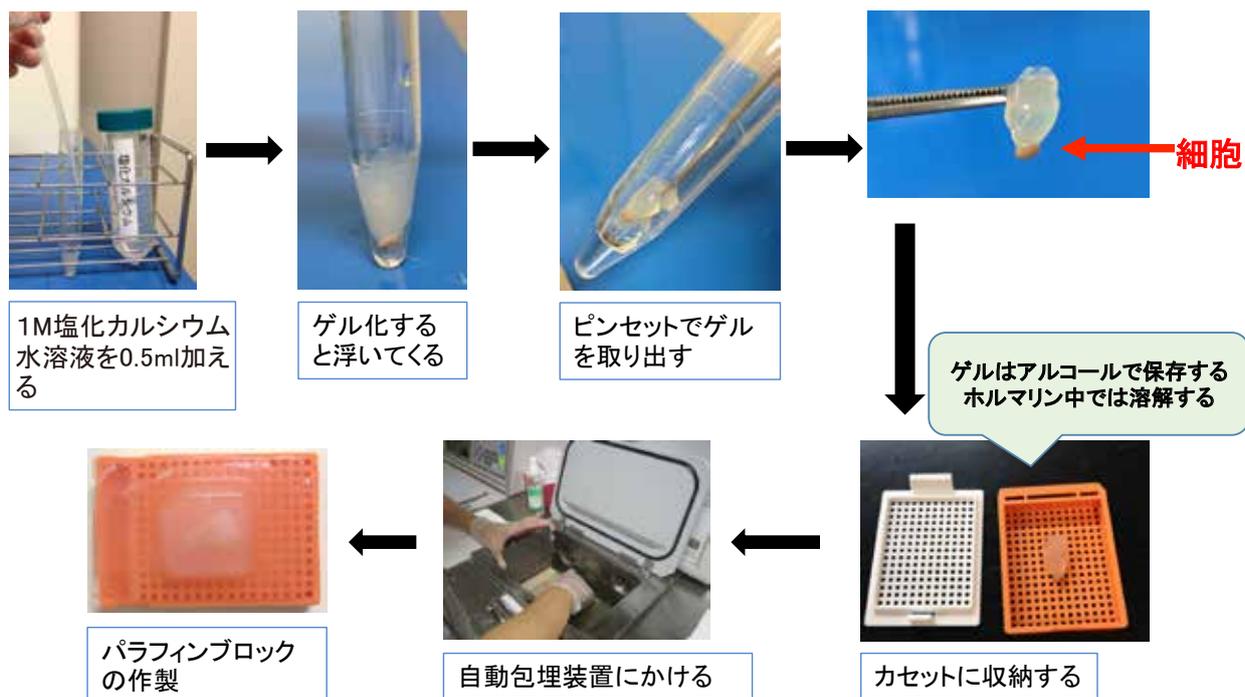
ホルモン受容体は、ベンチマーク（ロシュ）、Dako Autostainer（アジレント）、BOND（ライカ）、HER2蛋白は、ベンチマークとDako Autostainer、HER2 DISHは、ベンチマークで、良好な染色性であることを確認した。

図 アルギン酸ナトリウム法によるセルブロック作製¹¹⁾



固定終了からアルギン酸ナトリウム加細胞沈渣作製までの工程は約20分程度

カセット収納までの工程は約15分程度



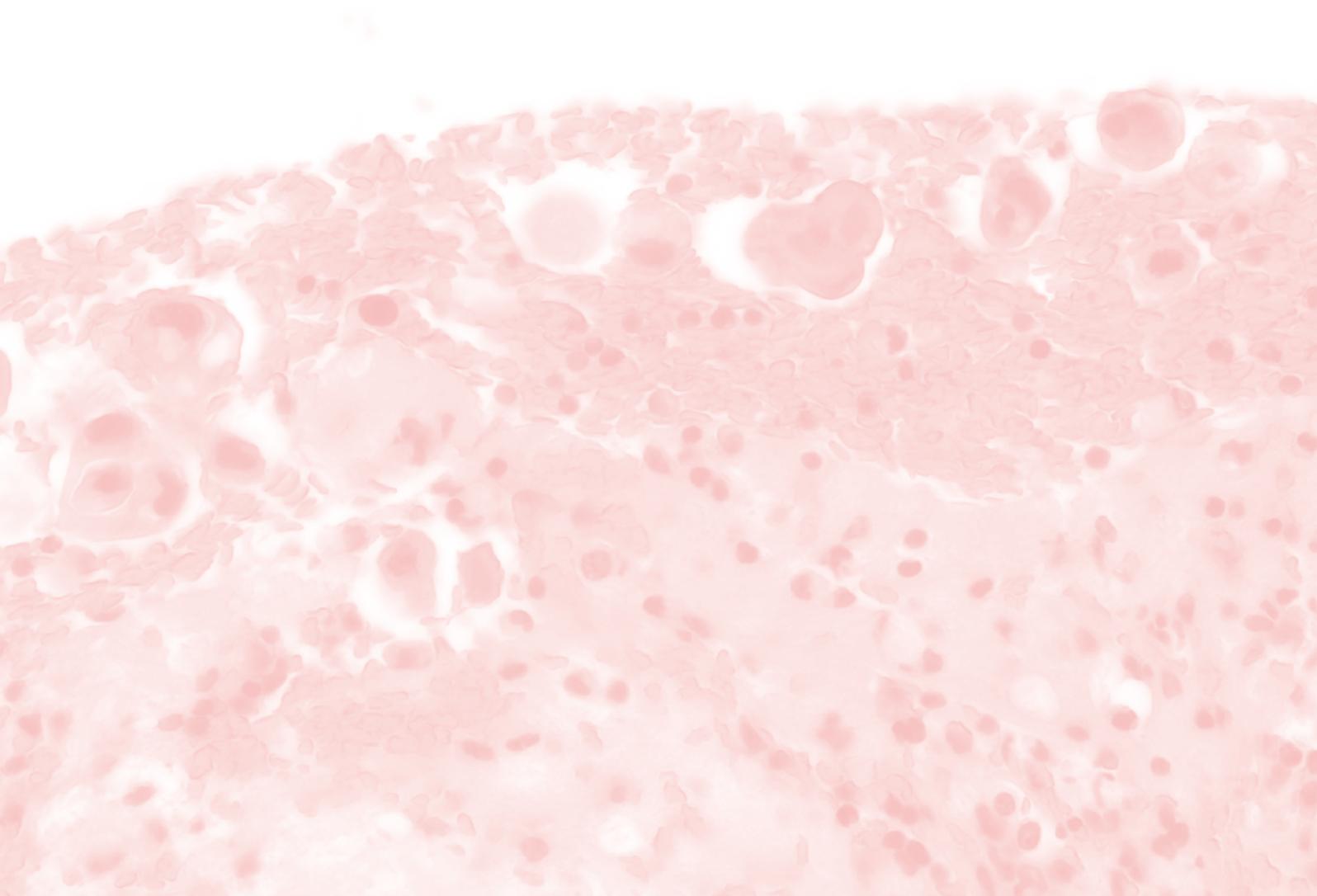
5. 結果判定方法

(1) ホルモン受容体

腫瘍細胞が多く混在非腫瘍細胞が少ない場合は、組織検体と同様の判定基準で判断できるが、そのような検体は少ない。そこで、まず臨床医に陽性腫瘍細胞があるかないかを報告する必要があるため、報告書には陽性か陰性かを最初に記載し、可能であれば各施設で用いている組織標本の報告様式に準じた記載を併記するとよい。

(2) Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2 (HER2)

HER2蛋白免疫染色およびDISH法ともに、個々の腫瘍細胞の染色性については、組織標本と同様の判定基準で判定可能であるが、多数の腫瘍細胞が密にみられる場合以外は、陽性細胞が腫瘍細胞中に占める割合の判定は難しい。判定上の注意点としては、HER2蛋白免疫染色は、陽性(3+)判定以外では、セルブロック標本と組織標本の一致率が低い¹²⁻¹⁴⁾ため、判定を厳密に行う必要がある。セルブロックと組織検体のDISH検査の一致率は高く⁷⁾、equivocal の場合にDISH法を併用すると、組織標本とほぼ同様の結果が得られるという検討結果も得ているため¹⁰⁾、1+と2+、あるいは2+と3+で判定に迷った場合は、2+と判定して、DISH法を併用することが望ましいと考える。



6. 判定例

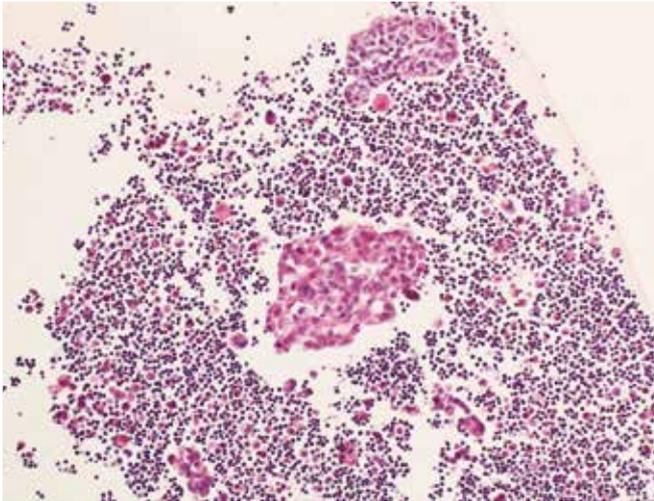
(1) ホルモン受容体

エストロゲン受容体 (ER)

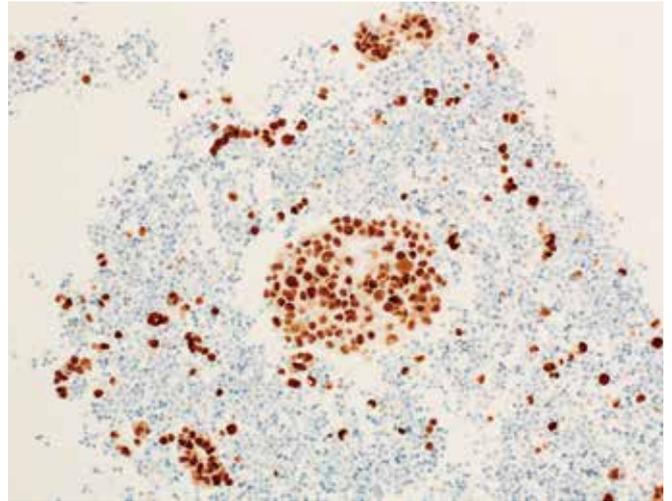
プロゲステロン受容体 (PR)

①陽性

胸水

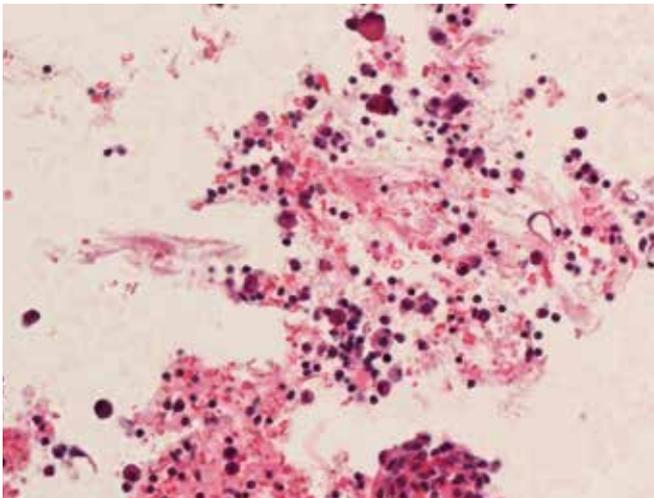


HE
炎症細胞を背景に、多数の腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 20 倍)

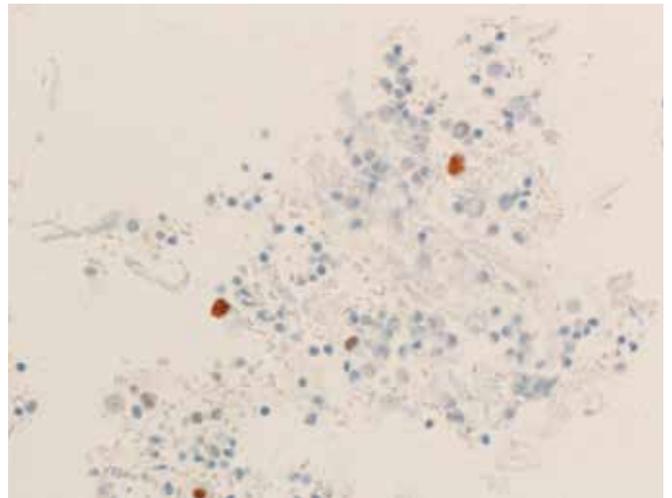


ER ベンチマーク（ロシュ）にて染色
ほぼすべての腫瘍細胞の核が陽性に染色されている。
(対物倍率 20 倍)

腹水

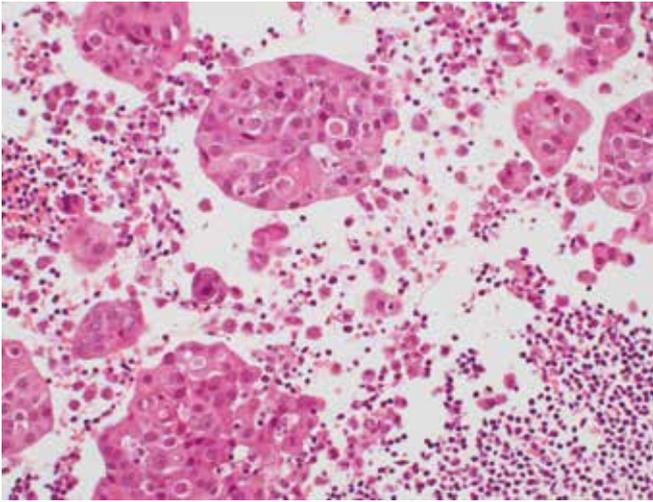


HE
多数の炎症細胞や中皮細胞を背景に、腫瘍細胞の小型細胞集塊が少数みられる。
(対物倍率 40 倍)

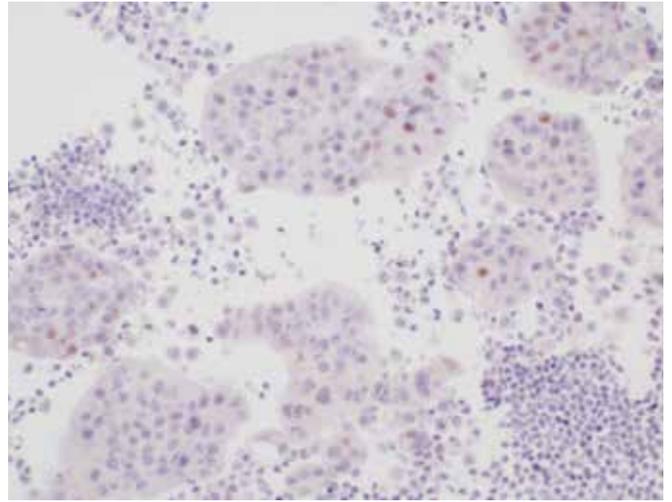


PR ベンチマーク（ロシュ）にて染色
非腫瘍細胞と混在して、核が陽性に染色される腫瘍細胞が少数みられる。
(対物倍率 40 倍)

胸水

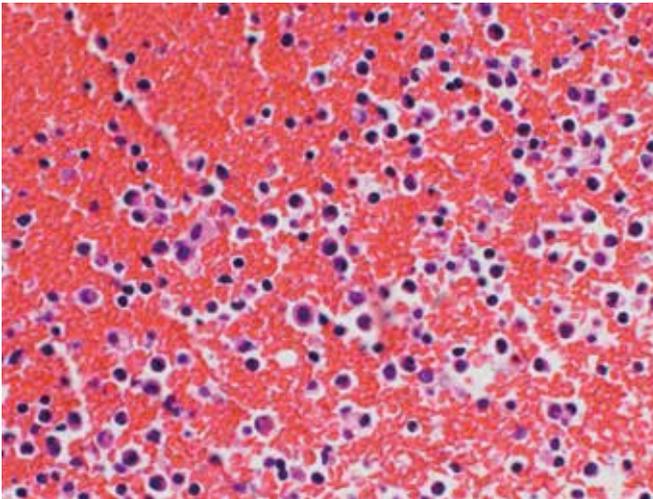


HE
多数の炎症細胞や中皮細胞を背景に、腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 20 倍)

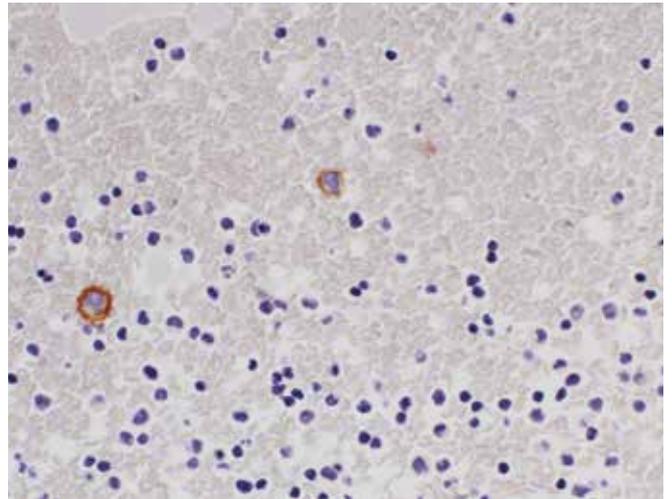


ER ベンチマーク (ロシュ) にて染色
腫瘍細胞の核が弱陽性に染色されている。
(対物倍率 20 倍)

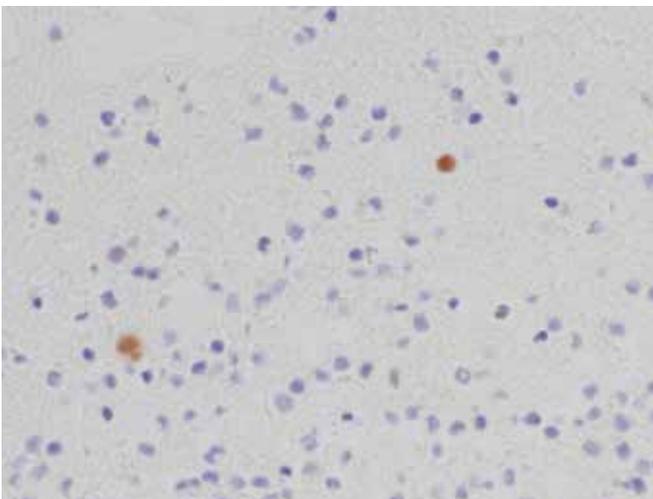
腹水



HE
多数の炎症細胞や中皮細胞がみられる。腫瘍細胞の同定が難しい。
(対物倍率 40 倍)



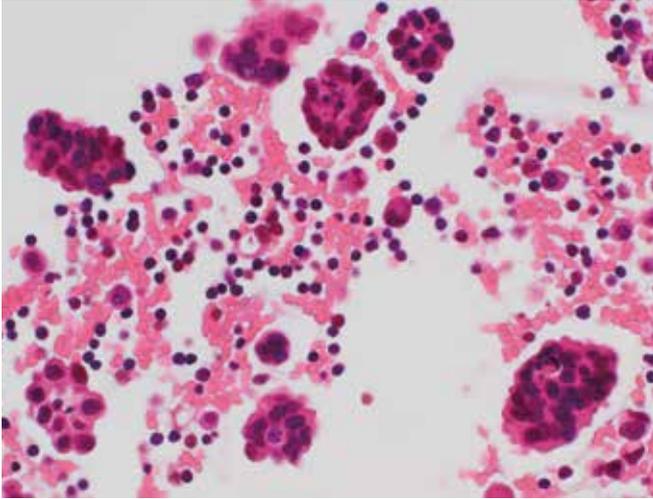
BerEP4
異型上皮細胞が少数確認される。
(対物倍率 40 倍)



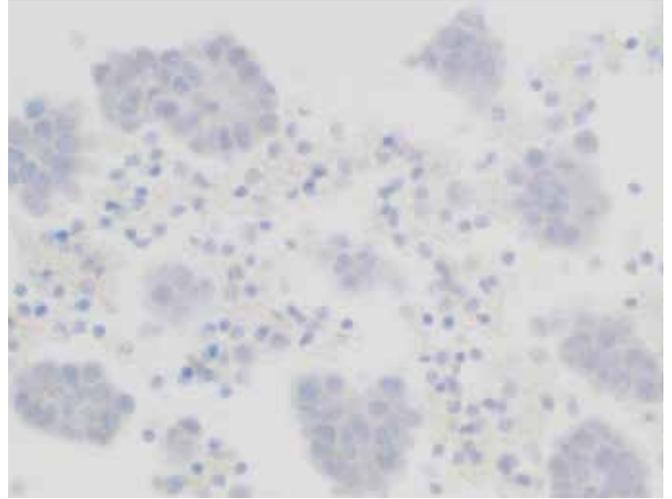
ER ベンチマーク (ロシュ) にて染色
腫瘍細胞の核が陽性に染色されている。
(対物倍率 40 倍)

②陰性

胸水



HE
炎症細胞を背景に、腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 40 倍)

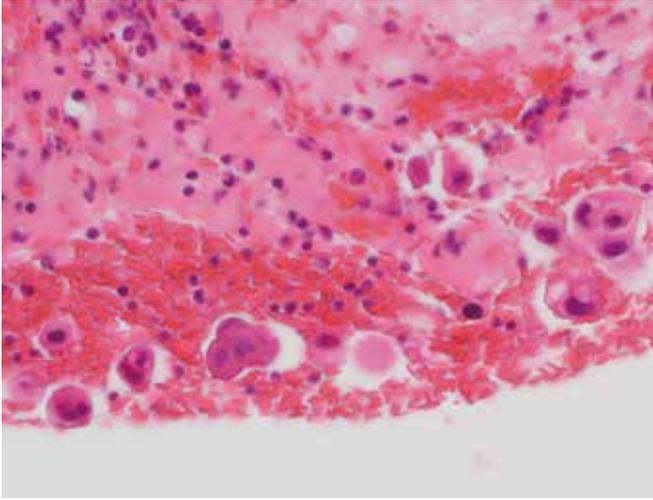


ER ベンチマーク（ロシュ）にて染色
すべての腫瘍細胞の核が染色されていない。
(対物倍率 40 倍)

(2) HER2

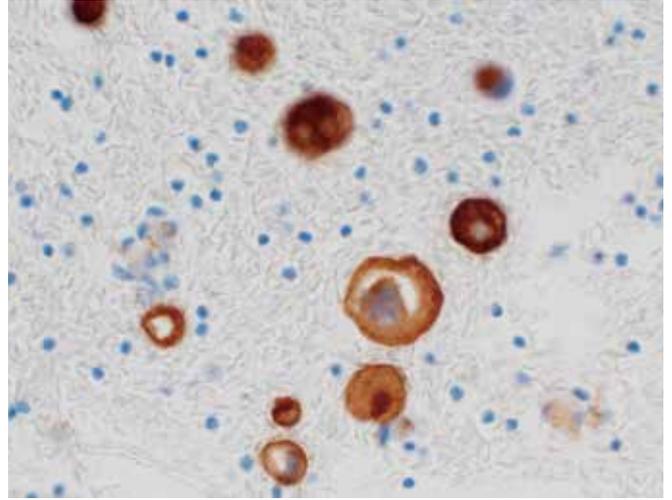
①陽性 (スコア 3+)

胸水

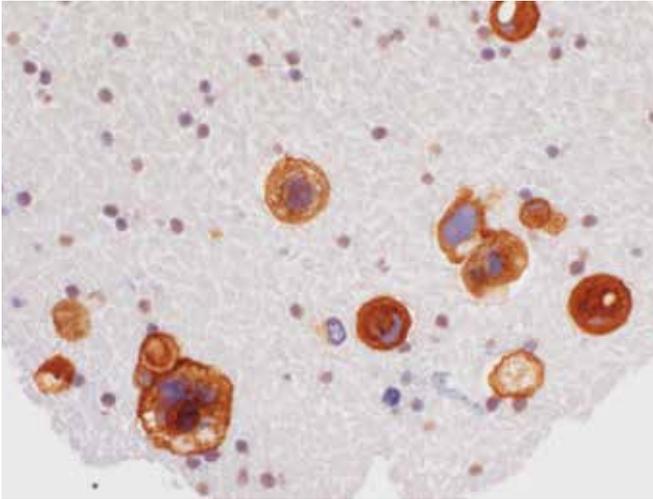


HE

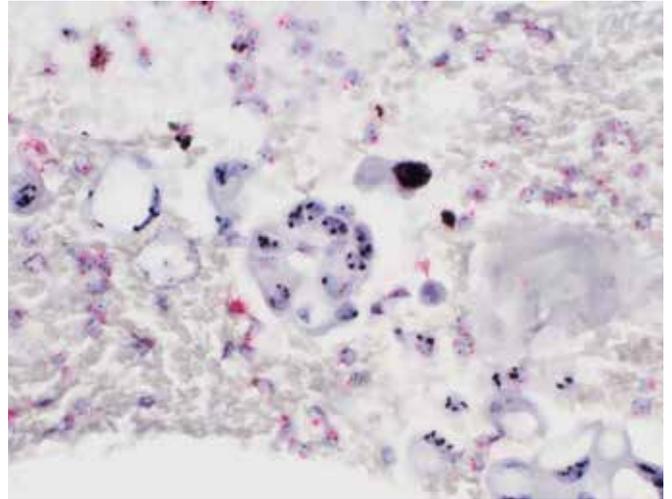
出血性背景に、腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 40 倍)



HER2 蛋白 ベンチマーク (ロシュ) にて染色
腫瘍細胞の細胞膜に強い完全な全周性の染色性がみられる。
(対物倍率 40 倍)



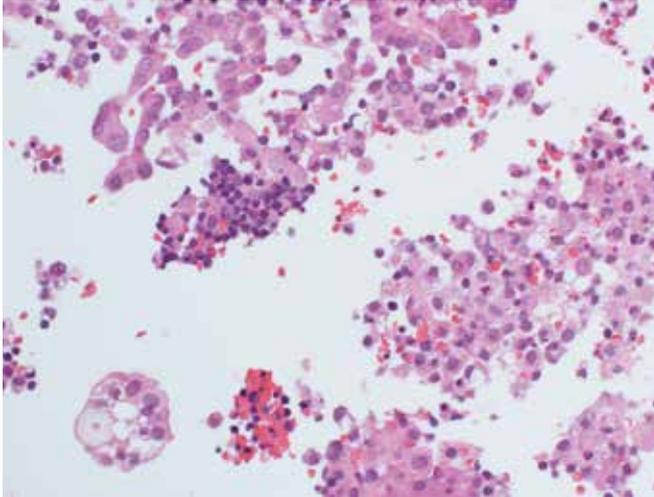
HER2 蛋白 Dako Autostainer (アジレント) にて染色
腫瘍細胞の細胞膜に強い完全な全周性の染色性がみられる。
(対物倍率 40 倍)



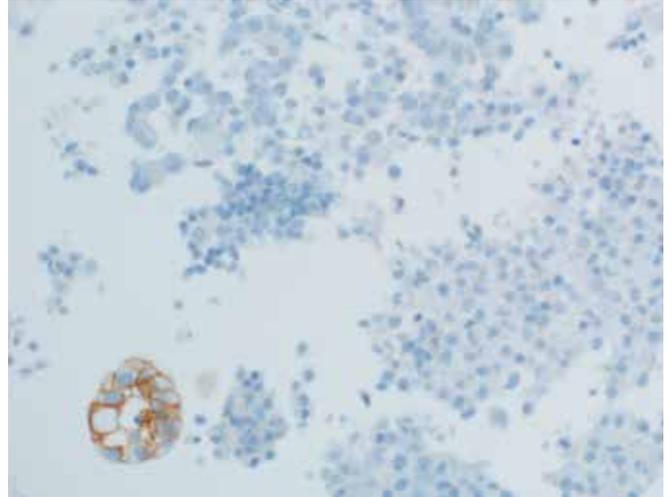
HER 2 遺伝子 FISH 法 ベンチマーク (ロシュ) にて染色
腫瘍細胞の核内に、HER2 遺伝子の増幅がみられる (HER2/CEP17
シグナル比 15.7).
(対物倍率 40 倍)

② Equivocal (スコア 2+)

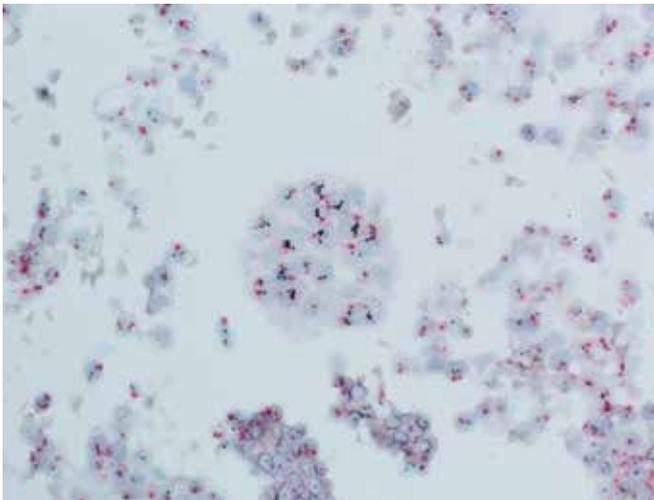
胸水



HE
多数の組織球を背景に、腫瘍細胞集塊が1個みられる。
(対物倍率 40 倍)

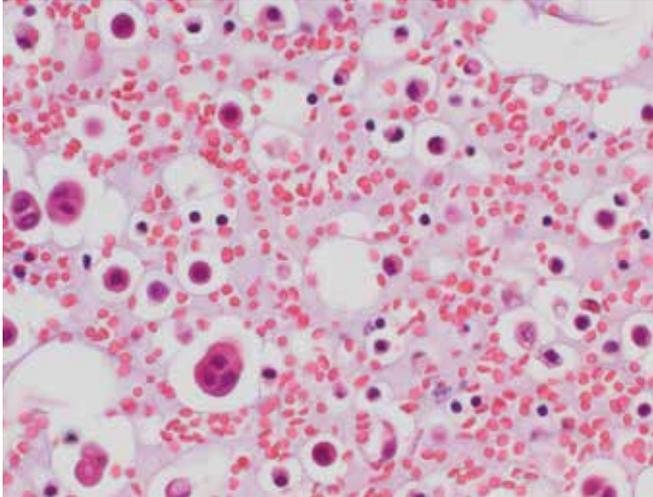


HER2 蛋白 ベンチマーク (ロシュ) にて染色
腫瘍細胞の細胞膜に中等度の完全な全周性の染色性がみられる。
(対物倍率 40 倍)

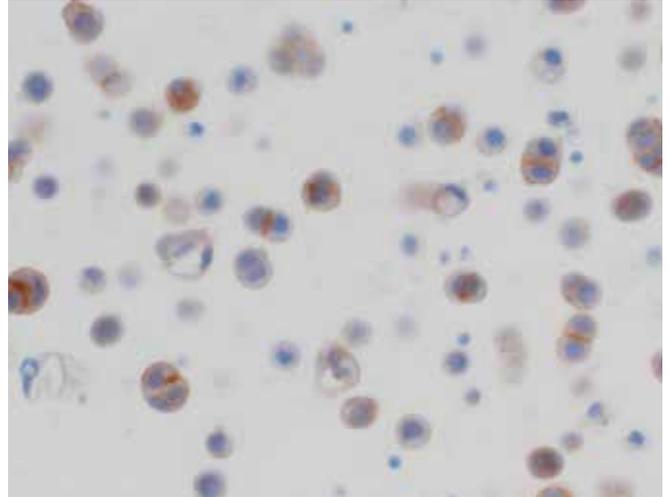


HER 2 遺伝子 DISH 法 ベンチマーク (ロシュ) にて染色
腫瘍細胞の核内に、HER2 遺伝子の増幅がみられる (HER2/CEP17
シグナル比 3.0).
(対物倍率 60 倍)

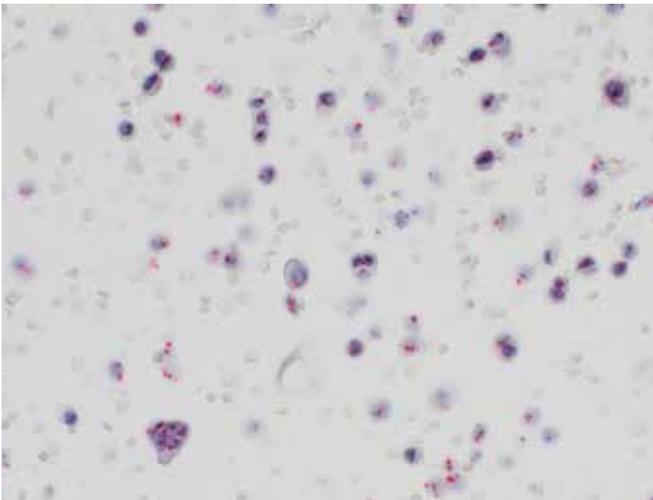
胸水



HE
出血性背景に、小型腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 40 倍)



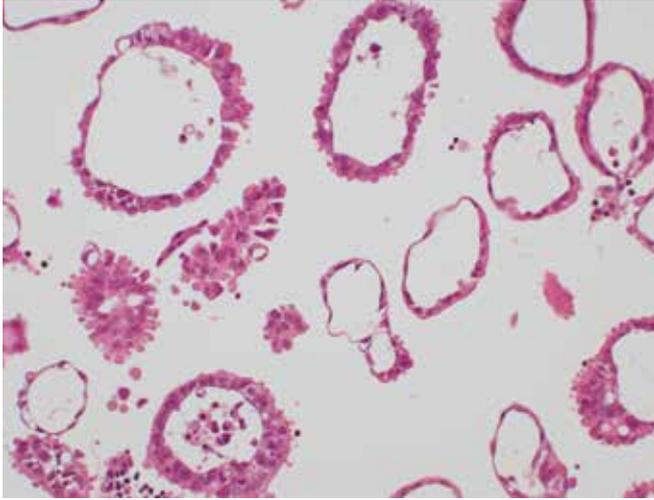
HER2 蛋白 ベンチマーク（ロシュ）にて染色
腫瘍細胞の細胞膜に弱いが完全な全周性の染色性がみられる。
(対物倍率 40 倍)



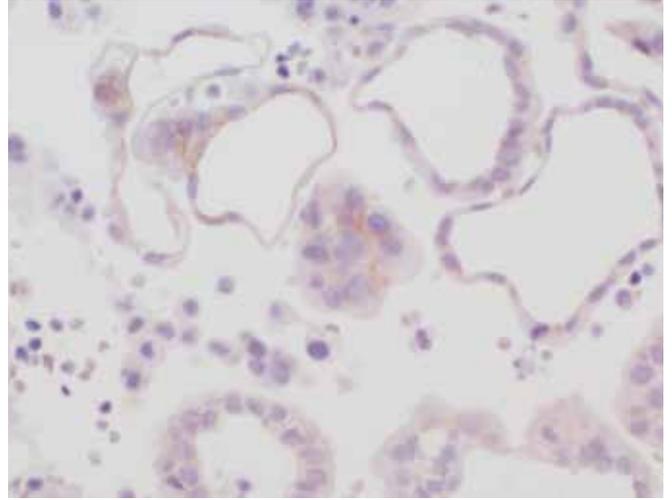
HER 2 遺伝子 FISH 法 ベンチマーク（ロシュ）にて染色
HER2 遺伝子の増幅はみられない(HER2/CEP17 シグナル比 1.1).
(対物倍率 40 倍)

③陰性（スコア 1+）

胸水

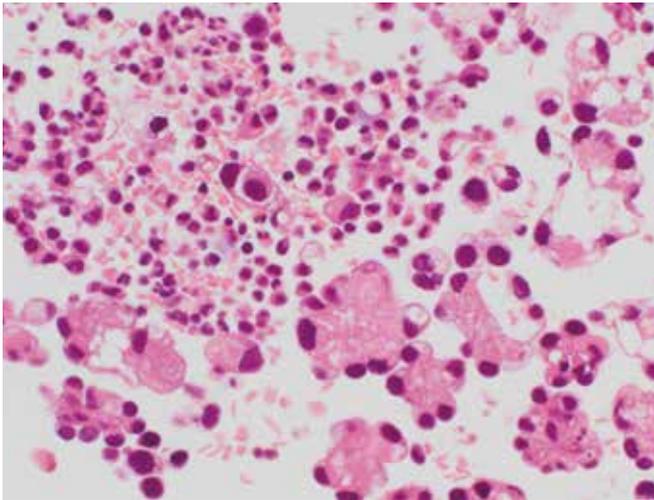


HE
腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 40 倍)

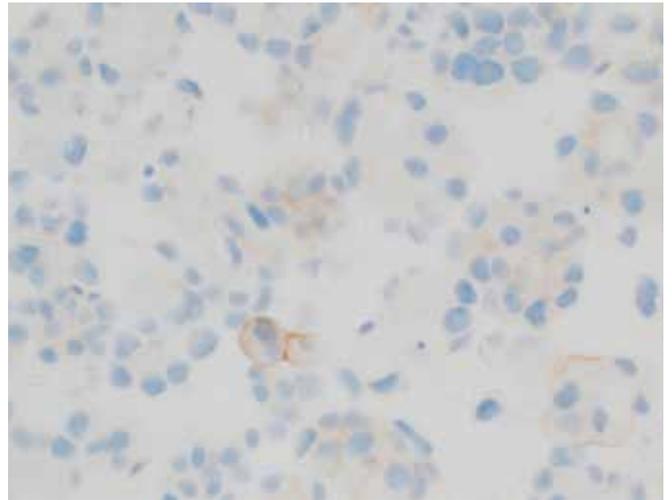


HER2 蛋白 ベンチマーク（ロシュ）にて染色
腫瘍細胞の細胞膜に、弱く不完全な染色性がみられる。
(対物倍率 40 倍)

胸水



HE
腫瘍細胞集塊がみられる。
(対物倍率 40 倍)



HER2 蛋白 ベンチマーク（ロシュ）にて染色
腫瘍細胞の細胞膜に、弱く不完全な染色性がみられる腫瘍細胞が少数認められる。
(対物倍率 40 倍)

7. 参考文献

1. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al.: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*: 28: 2784-2795, 2010
2. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al.: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*: 31: 3997-4013, 2013
3. Nishimura R, Aogi K, Yamamoto T, et al.: Usefulness of liquid-based cytology in hormone receptor analysis of breast cancer specimens. *Virchows Arch*: 458: 153-158, 2011
4. 西村理恵子, 山本珠美, 香川昭博, 他: セルブロックを用いた乳癌ホルモン受容体判定. *日臨細胞誌*: 51: 323-328, 2012
5. Nishimura R, Kagawa A, Tamogami S, et al.: Correlation of HER2 gene status assessment by fluorescence in situ hybridization between histological sections and cytological specimens of breast cancer. *Breast Cancer*: 23: 211-215, 2016
6. Hartman AK, Gorman BK, Chakraborty S, et al.: Determination of HER2/new status: a pilot study comparing HER2/neu dual in situ hybridization DNA probe cocktail assay performed on cell blocks to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization performed on histologic specimens. *Arch Pathol Lab Med*: 138: 553-558, 2014
7. Nishimura R, Okamoto N, Satou M, et al.: Bright-field HER2 dual in situ hybridization (DISH) assay on breast cancer cell blocks: A comparative study with histological sections. *Breast Cancer*: 23: 917-921, 2016
8. Beatty BG, Bryant R, Wang W, et al.: HER-2/neu detection in fine-needle aspirates of breast cancer: fluorescence in situ hybridization and immunocytochemical analysis. *Am J Clin Pathol*: 122: 246-255, 2004
9. Sartelet H, Lagonotte E, Lorenzato M, et al.: Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J Clin Pathol*: 58: 864-871, 2005
10. Nishimura R, Okamoto N, Satou M, et al.: HER 2 immunohistochemistry for breast cancer cell blocks can be used in the same way as that used for histological specimens. *Diagn Cytopathol*: 44: 274-279, 2016
11. 西村理恵子. 細胞診検体を用いたレセプター検索 (セルブロック法). 乳房超音波ガイド下針生検マニュアル: 細胞診から吸引式組織生検まで (日本乳腺甲状腺超音波医学会インターベンション研究部会編). アトムス, 東京, 93-96, 2016
12. Bueno Angela SP, Viero RM, Soares CT: Fine needle aspirate cell blocks are reliable for detection of hormone receptors and HER-2 by immunohistochemistry in breast carcinoma. *Cytopathology*: 24: 26-32, 2013
13. Monaco SE, Wu Y, Teot LA, et al.: Assessment of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status in the fine needle aspirates of metastatic breast carcinomas. *Diagn Cytopathol*: 41: 308-315, 2013
14. Kinsella MD, Birdsong GG, Siddiqui MT, et al.: Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 in formalin-fixed breast carcinoma cell block preparations: correlation of results to corresponding tissue block (needle core and excision) samples. *Diagn Cytopathol*: 41: 192-198, 2013



2017年12月