

細胞診検査における液状検体から効率的に細胞成分を回収することを目的とした凝集剤の開発

富山大学大学院 井村 穰二

1. 研究の実施内容及び成果に関する報告書

(1) 研究概要

これまで医学的検査の中で、病理診断は疾病そのものを診断する重要な検査であり、実際の現場でも日々数多くの検体が提出されている。その中でも、細胞診検査は、侵襲性が低く、安価、迅速性に優れているため各医療施設で多用されており、各施設とも標本の作成は日常的な作業として、中規模の病院（500床程度）でも80-100例以上/日という膨大な数が実施されている。その中で液状検体（尿、胸腹腔内貯留液体）の標本作成は独特で、通常の塗抹検体とは異なり、各種の処理が必要となってくる。概略的には遠心操作による細胞の回収が作業の大半を占めている。しかし、操作も煩雑であり、高額な機器も必要となり、多検体処理には向かない点も多く、効率的に細胞を回収する点でも一部に問題を抱えている。これまでこの様な問題を解決するが如く幾つかの試みが成されてきたが、一般化していないのが現状である。その原因としては、上記の問題点を完全に解決出来ていない点であるが、その中でも最も大きな障害としては、作業効率の向上が図られていない点である。最も各施設で用いられている方法としては、セルブロック法が上げられるが、これとて幾つかの作業工程を経なければ作成出来ない。また、標本を作成後の残りの検体中にも細胞が存在していることは知られているが、多くの病院ではそれらを廃棄している。この残りの細胞には更に検索すべき項目をあり、それらを廃棄することによって、施行も難しい。この様に、現在までも簡便な方法の開発は試みてきたが、いまだ確立した方法がない。それらの問題の一部でも解決出来る手段を開発することが本研究の主たる目的である。

本研究で用いる凝集剤は環境保全の観点から開発された工業製品であるが、これらを用いて医療関係への応用を考案してみた。即ち、前述の液状検体の処理に関わる各種の問題点を解決するための一環として、検体中に浮遊している細胞を効率的に捕集し、時間を短縮かつ遠心分離等の手順を省くことで、低コスト化を実現するアイデアが共同開発先のインパクトから提案された。

本研究では中規模病院の検査室でも実施可能な、簡便かつ汎用な細胞診検査のための標本作成に利用できる凝集剤を開発する。そのためには、目的とする細胞を的確かつ高効率に回収可能かつ低コストであることが要求される。

(2) 研究の実施内容及び目標達成状況

1)材料

膀胱がんおよび慢性膀胱炎患者などの自然尿（約30-50ml）並びに肺がんおよび非腫瘍性患者貯留胸水の検体を無作為に選択し、通常の細胞診検査のために供された後の残余検体を本研究の材料とした。用いた残余検体を下記の方法で処理を行った。

2)方法

a) 各種（高～低）カチオン、アニオンの凝集剤を種々の割合で尿検体と混合し、凝集の有無を確認した。

- b) 凝集促進剤として、ポリ塩化アルミニウムと硫酸アルミニウムを上記、凝集剤と混合した検体に加え、震盪混和して凝集塊の形成が促進されるか検討した。
- c) 上記 2)-a) 並びに b) で得られた凝集塊を手で回収し、20%緩衝ホルマリンで1時間固定後、通常のパラフィン包埋切片をヘマトキシレン・エオジン染色を施し、顕微鏡下に観察した。

3)結果

a)凝集剤を用いた尿並びに胸腔貯留液体の凝集

高～低濃度のカチオンならびにアニオン凝集剤液を下記の表の如く組み合わせを行ったところ、最も凝集塊の大きな組み合わせは高カチオン、高アニオン液の等量混合液であった(添付資料表1)。

肉眼的には、混濁した液体中に肉眼で確認出来る、1mm大の凝集塊をみとめ、手でそれを回収することが可能であった(添付資料図1)。

b)凝集剤により得られた凝集塊の組織学的観察

高カチオン、高アニオン等量混合により得られた細胞凝集塊は組織学的に蛋白質を主体とする凝固物で、多くはフィブリンからなり、内部に単離性の細胞を詳細に観察できるまでの細胞成分が回収することが出来た(添付資料図2)。

c)凝集促進附加剤の効果

凝集促進剤の効果としては、凝集剤のみでは、検体の混濁と浮遊する凝集塊を認める程度であったが、促進剤を添加することでゼラチン状の固形物が観察され、容易に固形物が回収できた(添付資料図3)。

d)凝集促進剤添加により得られる固形物内の細胞像

促進剤添加検体の組織像では、ポリ塩化アルミニウム添加群でも、硫酸アルミニウム添加群でも、同様に、両者とも細胞数に関わらず多くの細胞を回収することができた(添付資料図4)。

e)まとめ

検体中に剥離してくる細胞数が少ない尿並びに胸水検体でも、従来の作製法に比して、簡便で、確実・優位に目的とする細胞を回収することが可能となった。特に、細胞凝集剤単独でも細胞の回収は可能であったが、凝集促進剤であるポリ塩化ないしは硫酸を添加することで、より効率の高いかつその後の作業がし易く、簡便化することができるようになった。

(3) 現状における課題、問題点

本研究では中規模病院の検査室でも実施可能な、簡便かつ汎用な細胞診検査のための標本作成に利用できる凝集剤を開発することで、そのためには、目的とする細胞を的確かつ高効率に回収可能かつ低コストであることが要求された。当初、凝集剤のみでそれらが可能かと思われたが、予想に反して、凝集塊は小型で、手で回収出来、組織学的観察にも対応できたが、集塊が脆く、標本の作製に難渋する点が問題であった。これらを解決する手段として

ポリ塩化アルミニウム、硫酸アルミニウムなどの促進剤を添加することで、ゼラチン状の固形物が作成出来、その後の標本作成を容易とした。

但し、細胞密度が低い生体サンプルを効果的に凝集する方法を確立することが課題であり、時によっては遠心操作が必要になってくる。この点を解決する新たな手段を考慮しなければならない。本研究で用いた凝集剤ならびに促進剤は安価であり、市場への導入には問題ないが、使用する施設への説明がある程度必要となってくる。

(4) 今後の目標と展開、事業化の見込み

今後は、量的に多い検体はそれに応じて内部に含まれる細胞も多いと考えられ、試験管レベル（15ml）からもっと量的に多い（約50～100ml）に検体への展開が必要かと思われる。その為の試みとして、攪拌操作に平行して凝集剤と促進剤を添加する手段を行っている。現在までの検討からでは、各医療施設の導入出来る細胞凝集剤としての製品化を完成するには至っていないが、ある程度の問題点を解決する一手段としての成果は得られたと思われる。より事業化を図るためには、多施設において評価が必要かと思われる。

表1. 各種カチオンならびにアニオン液の等量混合液に対する細胞並びに赤血球凝集塊の形成

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
カチオン	高	高	高	中	中	中	低	低	低
アニオン	高	中	低	高	中	低	高	中	低
細胞凝集塊	+++	+	++	+	++	++	++	+	-
赤血球凝集	++	+	+	-	-	-	-	-	-



図1. 血性胸水検体に対する高カチオン、高アニオン凝集剤の効果

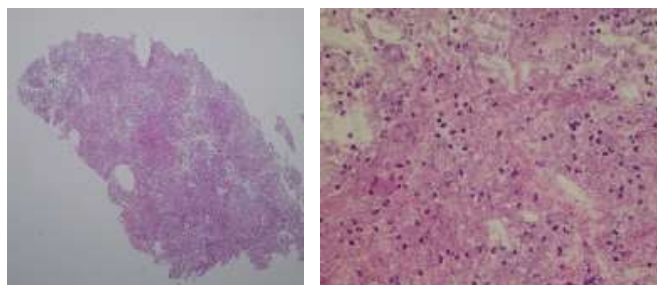


図2. 凝集塊の組織像。左:弱拡大、右:強拡大。

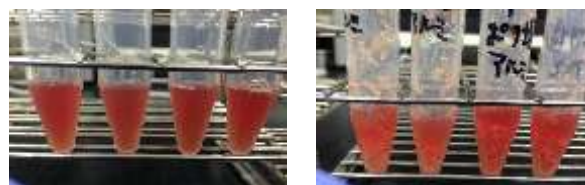


図3. 凝集促進剤の効果（左図：凝集剤のみ、右図：促進剤添加）。

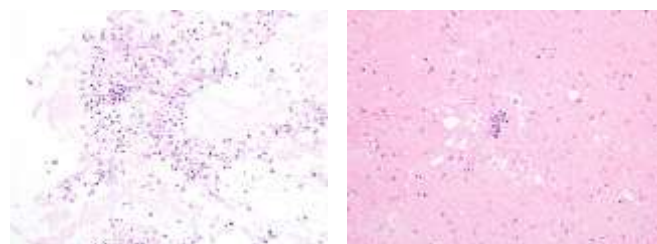


図5. 促進剤添加検体組織像。左図:ポリ塩化アルミニウム、右図:硫酸アルミニウム。