

口腔の液状化検体細胞診の可能性



新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔病理学分野 教授
(元 朝日大学歯学部 口腔病態医療学講座 口腔病理学分野 主任教授)

田沼 順一 先生

BD Oral Cytology Report Vol.1

厚生労働省 2015 年口腔・咽頭がんの予測死亡者数は約 7,000 人を超えており、癌全体の約 2 % である。5 年生存率はステージによって異なるが、例えばステージ 1 では 70% 以上という高い値を示す。すなわち口腔がんにおける早期発見・治療の重要性は他臓器のがんと同様であると言える。しかし直視・直達可能な口腔がんにおいても、意外に早期の診断は困難であることが多い。

口腔がんの大部分は、重層扁平上皮からなる口腔粘膜上皮に由来する扁平上皮癌であるが、発がんメカニズムや病理組織像の多彩性は一般には十分に理解されていない。そのために診断基準は WHO Classification of Head & Neck Tumours (World Health Organization)、口腔癌取扱規約 (日本口腔腫瘍学会) および頭頸部癌取扱規約 (日本頭頸部癌学会) により、Dysplasia 分類だけでなく SIN・OED・OIN・Binary System 分類も加わり、一番理解しているはずの口腔病理専門医でさえ混乱しているのが現状で、診断基準は各施設の病理医に委ねられている。

一方、口腔がん早期発見の観点から、口腔検診における擦過細胞診の

有用性とその精度向上について、様々な努力と工夫がなされてきた。擦過細胞診の領域においては子宮頸部粘膜病変における診断基準が先駆的であり、口腔もそれに準じて行われてきたが、口腔粘膜病変の特異性、特に表層に角化性分化を示しながらも深層で腫瘍が浸潤増殖する特性から、2015 年の新ガイドラインにおいては表層分化細胞の異型を検出し、口腔・頭頸部外科での精査・対応を提示できるプロトコルが推奨されつつある。そこで日本臨床細胞学会の口腔細胞診ワーキンググループは、婦人科領域で多用されていた Papanicolaou 分類に変わり、世界的な診断基準であるベセスダシステムへの移行を新たな口腔細胞診のガイドラインとして完成させた。これにより口腔の前癌病変を含む早期癌の診断基準が画一化し、明確な診断基準が確立された。このような口腔領域の細胞診を取り巻く状況に鑑みて、今回は口腔粘膜擦過細胞診の新分類、口腔領域における液状化検体細胞診 (Liquid-based cytology: LBC)、BD シュアパス™ 法における免疫染色、RNA 抽出および RT-PCR 法の解析について解説する。

01 口腔細胞診の診断基準

前述のように、口腔細胞診の領域は子宮頸部粘膜病変の診断基準であった Papanicolaou 分類 (5 段評価) を参考に行われてきたが、2015 年の秋から婦人科領域でも新しく採用されているベセスダシステムを応用させた口腔診断の診断基準を採用している。すなわちベセスダ分類に準じた口腔細胞診の診断は 4 段階で、現在の WHO の組織診断基準に対応させた場合、NILM は hyperkeratosis や squamous cell hyperplasia に、LSIL は mild or moderate epithelial dysplasia に、HSIL は severe epithelial dysplasia や carcinoma in-situ に、SCC は squamous cell carcinoma に対応する (図 1)。

今後は、LSIL と HSIL の診断基準に明確な所見ポイントを定める、他臓器と同様に報告様式を標準化するなどの対応が必要である。

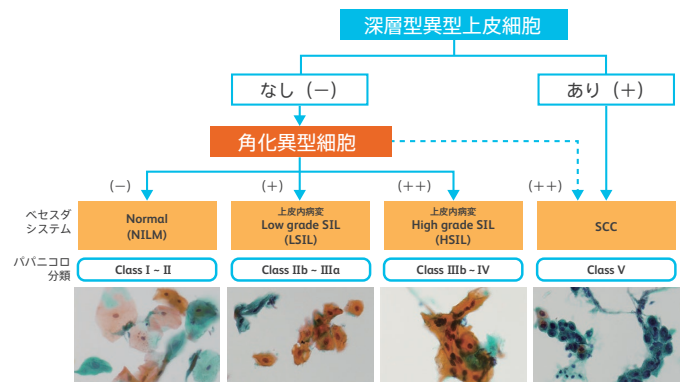


図 1 ベセスダシステムによる口腔細胞診の診断基準¹⁾ (細胞診ガイドライン 5 消化器 p24 より一部改定)

02 LBC 法 (BD シュアパス™ 法) による標本作製

ヒトおよびラットの舌がん検体により LBC 法の標本作製した。LBC 法には手軽で比較的安価なコストで実施可能なものもあり、海外および国内の研究施設で多く採用されている。朝日大学歯学部附属病院病理診断科では ThinPrep® 2000 (ホロジックジャパン株式会社) が設置されているが、歯学部口腔病理学分野では、免疫染色や RNA 抽出までを考え、BD シュアパス™ 用保存液、もしくは BD サイトリッチ™ ブルー保存液を用いて標本作製する方法を導入した。細胞採取は、オーセレックス® プラシ RT (販売名: オーセレックスプラシ RT 製造販売届出番号: 07B1X00003000153) で口腔内を擦過して行っている。



03 LBC 標本の免疫染色

我々の病理診断科では、口腔の上皮異形成および扁平上皮癌を疑う際に、CK13、CK17、Ki67 の免疫染色をルーチンで行なっている (図 2)。

同様に BD シュアパス™ 標本においても免疫染色を以下のように行なった。スライドに採取細胞を塗抹後 30 分間エタノールに浸し、水洗、0.14 mol/L NaCl 含 0.01 mol/L PBS に浸漬した。次いで 3% H₂O₂ に 10 分間反応させることで内因性ペルオキシターゼ活性を阻害し、流水下で洗浄後、PBS に浸漬した。抗原賦活処理を行い、非特異反応を防ぐための 1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で希釈した 1 次抗体を 90 分間反応させた。PBS で洗浄後、シンプルステイン MAX-PO(M) (株式会社ニチレイバイオサイエンス) を二次抗体に使用した。発色基質は DAB を用い、核対比染色はヘマトキシリンで行った。水洗後、脱水および封入をした。ヒトの口腔癌細胞における CK17 および p53 の免疫染色結果を右に示す (図 3-5)。

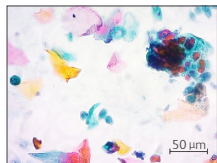
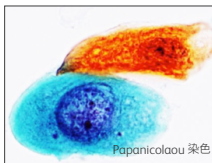
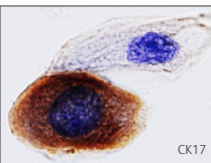


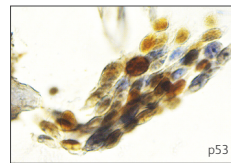
図 3 口腔の扁平上皮癌



Papanicolaou 染色



CK17



p53

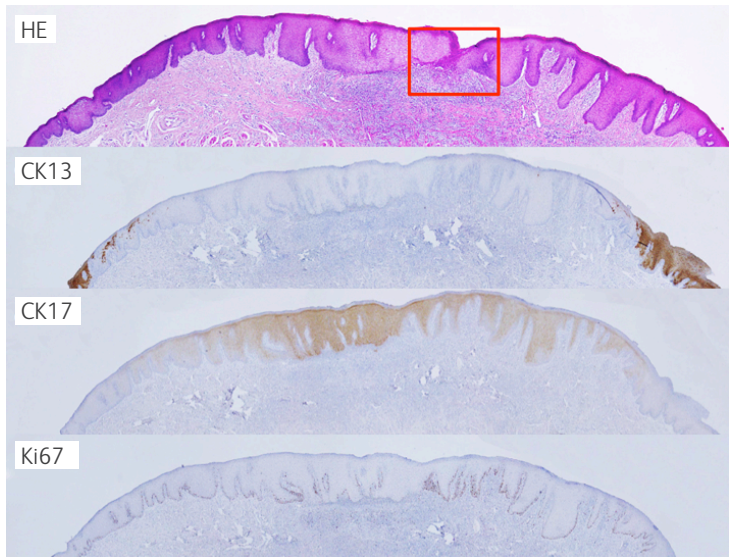


図 2 初期浸潤像を示す舌癌の組織像と免疫染色

04 LBC 検体からの RNA 抽出

4 種のヒト粘膜細胞 (細胞診の診断名: NILM・LSIL・HSIL・SCC) を BD シュアパス™ コレクションバイアルにそれぞれ保存し、ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega Co.) を用いて RNA を抽出した。抽出後、RNA の質確認のために電気泳動を行なった。抽出した RNA 濃度 (1 μg/μL 以上) での泳動時の撮影ゲルを示す (図 6)。Millennium Marker (0.5 ~ 9kb) を参考にすると、28S と 18S のバンドの位置は 28S で約 4700bp、18S は約 1800bp に相当しており、質的にも極めて純度の高い RNA が抽出された可能性を示している。

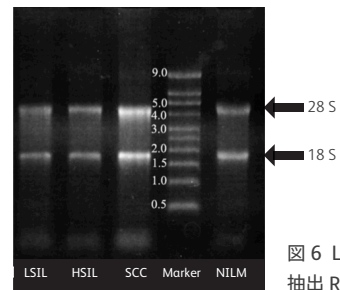


図 6 LBC 検体からの抽出 RNA 泳動時ゲル

05 相対定量的リアルタイム PCR 解析

抽出した total RNA を用いて cDNA に変換し、相対定量的リアルタイム PCR を $\Delta\Delta$ Ct 法により行ない、p53 の相対発現量を細胞診のベセスダ分類に対応させた。抽出した Total RNA からの逆転写・cDNA の合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いた。リアルタイム PCR は TaqMan Fast Universal PCR Master Mix、TaqMan Gene Expression Assays および Applied Biosystems StepOne™ Real time PCR systems (以上サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いた。

Normal で発現した p53 mRNA 量を 1 とした場合、NILM では 1.10 倍、LSIL では 1.20 倍、HSIL では 1.25 倍、SCC では 1.32 倍の発現量を示した。p53 の mRNA 発現量は Normal と LSIL ($p < 0.05$)、HSIL ($p < 0.05$) ならびに SCC 間 ($p < 0.01$) で明らかな有意差を認めた (図 7)。

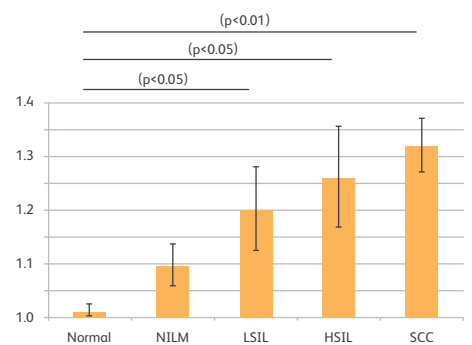


図 7 p53 の RT-PCR の解析結果

06 まとめ

口腔細胞診における BD シュアパス™ 法をさまざまな方法で検討した結果、以下の結論を得た。

- 1) BD シュアパス™ 法による口腔細胞診の LBC 標本は背景が鮮明であり、さらに免疫染色用標本を複数枚作製することが可能である。
- 2) BD シュアパス™ 法で固定した残検体からの核酸の抽出は容易であり、

量的・質的にも十分であった。これらを用いることで多くのバイオマーカーの検索が可能となるであろう。

- 3) 上記より BD シュアパス™ 法は、口腔領域の細胞診において極めて有用な方法であると考えられる。

引用文献

- 1) 日本臨床細胞学会. 細胞診ガイドライン 5 消化器. 東京: 金原出版; 2015. P.24

製造販売元

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

〒960-2152 福島県福島市土船字五反田1番地

本社: 〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

カスタマーサービス ☎ 0120-8555-90 FAX: 024-593-3281

bd.com/jp/