

— 総説 —

口腔疾患に対する口腔の液状化検体細胞診の有用性

— 早く・安く・正確な口腔細胞診 —

田沼順一

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔病理学分野 教授

The usefulness of oral LBC for oral diseases -Fast, cheap, and accurate of oral cytology-

Jun-ichi Tanuma

Division of Oral Pathology, Faculty of Dentistry & Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

令和2年4月1日受付 令和2年5月8日受理

キーワード：口腔がん, LBC (Liquid-Based Cytology) 法, 口腔細胞診, Papanicolaou 染色, ベセスダシステム

【はじめに】

2019年初頭、舌がんステージ4に罹患した女性タレントさんのSNSをきっかけに、日本中の大学病院および歯科病院の診療科はパニック状態でした。以前は歯科医師が口腔がんに遭遇するのは数十年に一度あるかないかと言われていましたが、2019年の国立がん研究センターの統計によると口腔・咽頭癌の罹患者数は約2万人で希少癌であるものの、死亡者数は約8,000人で罹患者数に対する死亡者数の割合が高く、子宮頸がんの6,600人と比べ極めて多いことを、歯科医師はもちろん一般国民は全く知られていないのが現状であり問題である¹⁾。

また口腔がんは突然発生(de-novo)することは少なく、ある段階を経て発生する(Carcinoma Sequence)ことが多い。2017年WHO Classification of Head and Neck Tumoursでは白板症、紅板症、口腔扁平苔癬、慢性カンジダ症などの口腔前癌病変・前癌状態の概念がOral Potentially Malignant Disorders (OPMDs: 口腔潜在的悪性疾患)に統合されて改称された²⁾。これら口腔がん発生前の段階での診療・診断は早期発見・早期治療の要となることは言うまでもない。一方、口腔粘膜は直視可能な部位であり、異常が生じた際には即座に病変の有無や良悪の判定が容易と思われる傾向があるが、口内炎や歯肉炎などが体調により症状の増悪と軽快を繰り返すおこるために、早期がんであっても患者が何の根拠もなく放置してしまうことが多く、悲惨な結果を生じている³⁾。

今回の総説では、新潟大学医歯学総合病院における近年普及したLBC (Liquid-Based Cytology: 液状化検体細胞診)法による口腔細胞診の現状と応用について報告する。

【口腔細胞診の現状】

2018年より本病院の病理部の歯科病理診断室において、切除・摘出物や術中迅速診断などの病理組織診断のみならず、LBC法による口腔細胞診を施行している。我々は、可能な限りほぼ全例の粘膜病変・唾液腺疾患および顎骨病変について、生検時もしくは切除・摘出時に、擦過細胞診・穿刺吸引細胞診を併せて施行し、組織学的所見と細胞学的所見との整合性を検討しています。現在、新潟大学歯学部口腔病理学分野では日本病理学会認定の口腔病理専門医・指導医は4名(田沼・丸山・山崎・阿部)、日本臨床細胞学会の細胞診歯科専門医は3名(田沼・山崎・阿部)なので、歯を含む軟・硬組織標本作製や悪性腫瘍の診断能力は、日本国内のみならず国外にも誇れるものである。

白板症(病理診断名ではない)を含む舌がんなどの悪性腫瘍は、生検による診断が必須とされてきたが、症例の多くは大学病院などの高次医療機関へ紹介され、そこで初めて生検とともに治療がなされているのが現状である。高次医療機関では、開業医での初診から数ヶ月が経っており、もう少し早く受診してくれれば、と思う悪性腫瘍の患者さんも稀ではありません。つまり治療を経て、本来求めた治療に結びつける事が出来なかった症例について、真正面から向き合う為には、できるだけ早期に病理組織検査を行うしか、他に方法はないのです。しかし歯科医師には病変の確認を行う責務があると思いますが、生検による切除は口腔外科専門医を取得している歯科医師しかできない行為で、私を含め一般歯科医師では技術的に不可能なことです。

そこで皆さんにお勧めできる手段としてはLBC法です。この口腔細胞診は、試料採取時の医師・患者への負

担が極めて少なく、機器の発展により、手技も容易になってきました。一方従来の細胞診は手間が煩雑で、経験や高度な技術が要求されて乾燥の失敗が多いのです。その欠点やエラーが無いLBC法を、新潟大学医歯学病院口腔再建外科・顎顔面口腔外科では医科と同様に施行している⁴⁾。

このような口腔粘膜疾患にも通じた歯科医療に対する真摯な態度は、必ず、皆さんの診療技術の向上とともに、口腔医として患者さんとの信頼関係の基盤として反映されてくるものと確信します。この機会に、「歯科疾患の病理組織検査（口腔細胞診）」を是非お勧めしたいと思います。特に近年、口腔がんの早期発見・早期治療の重要性がクローズアップされてきており、口腔細胞診を積極的な口腔がん検診へと利用されている歯科医師会が数多くあります。10年以上前から容易で早期発見可能な手段があるにもかかわらず、多くの歯科医師は口腔がんに対する勉強や経験不足からこのような悲劇が生じたことを認識して、是非ともこれらが二度と繰り返されないように理解し、学んで頂けたら幸いです。

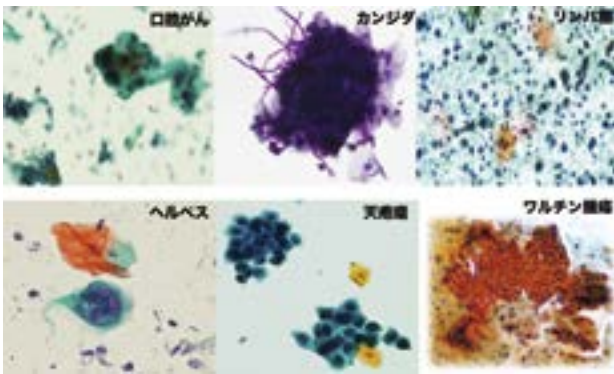


図1 主な口腔粘膜疾患の細胞診の組織像

ちなみに口腔細胞診で検出可能な主な疾患の細胞像を以下に紹介します（図1）。

【細胞診の採取・固定方法】

細胞診には2つの採取方法があります。1つは1928年にギリシャの医師 Papanicolaou 先生の報告によりこれまで利用されてきた従来法（Conventional Method）は、チェアサイドにおいて細胞診検体の採取と処理は、歯間ブラシで口腔粘膜を擦過した後、スライドガラスに直接塗抹する。塗抹後、あらかじめ用意されたエタノール液などの固定液に入れるか、細胞固定用スプレーをプレパラートに吹き付ける。採取した細胞が乾燥してしまうと形態が変化してしまうため、迅速に行う必要がある。

一方、近年、チェアサイドでの煩雑な操作を必要としないなどの利点があるLBC法が普及してきている。LBC法はブラシで粘膜を擦過した後、ブラシ自体を専用の細胞保存液に入れ、細胞を浮遊させる方法である（図2・3）。詳細の手順は、LBC法による口腔細胞診の採取方法を動



図2 LBC法のボトルとブラシ



図3 口腔細胞診専用ブラシによる採取方法

表1 従来法とLBC法の違い

	従来法	LBC法
チェサイドでの処理・時間・経験	煩雑・長い・経験が必要	容易・短い・経験が必要ない
標本の処理・時間	少ない・短い	やや多い・やや長い
標本の状態・観察範囲	汚い・広い	綺麗・狭い
採取細胞の標本化率	低い（ブラシに残る）	高い（ほとんど作製）
バーチャルスライド化	不可能	可能
免疫染色・遺伝解析	不可能	可能
費用	安価（約100円）	やや高価（約300円）

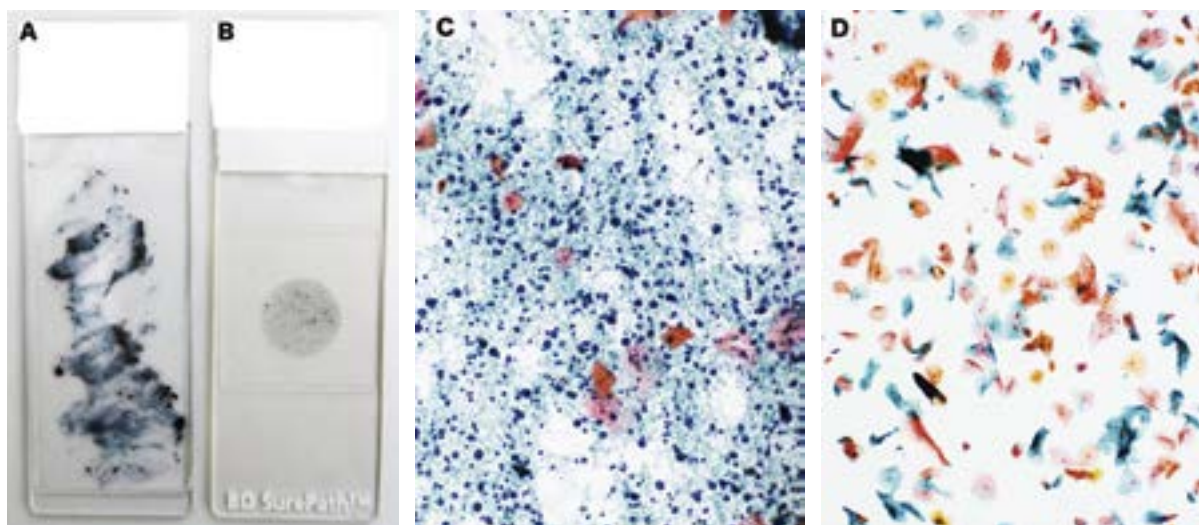


図4 標本上の細胞診の細胞像
マクロ像（A：従来法 B：LBC法） C：従来法の細胞像 D：LBC法の細胞像

画が掲載してある日本BD社のHPを参照してください。
<https://www.bdj.co.jp/cytology/products/koukuu.html>
従来法とLBC法との違いを表1に示す。

従来法では細胞の重なりが強くてすべての細胞の観察が困難な場合が多いが、LBC法では細胞をバラバラにして単層の細胞診標本を作製することができる。しかも従来法では採取された細胞のほとんどがブラシに残ったままであるが、LBC法ではほとんどの細胞をプレパラート上に載せることができる⁵⁾。これによって、診断に必要な分量の細胞がない「不適正標本」を少なくすることができ、スライドガラスへの塗布のばらつきがなくなることも利点である（図4）。そもそも、LBC法は子宮頸部検診の精度管理における標準化を行う一手段として広まったもので、欧米ではほとんどがLBCを用いている一方、我が国では未だわずかである。いくつかの報告では、従来法とLBC法を比較し、不適正検体が前者では12.4%、後者では8.8%と報告しており⁶⁾、別の報告では歯科診療所における細胞採取の経験が少ない歯科医師が行う場合もあることを考慮すると有効な方法であると考察している⁷⁾。

【口腔粘膜疾患における細胞診判定】

細胞診ガイドライン5 消化器 2015年版（口腔／唾液腺／消化管／肝胆道系／膵臓）において、まず検体不適正（inadequate）および検体適性（adequate）に区分される⁸⁾（図5）。検体適性では表2に挙げるように5つの区分に分けられている。NILMはnegative for intraepithelial lesion or malignancyの略で、正常および反応性あるいは上皮内病変や悪性腫瘍性変化がないものである。LSILはlow-grade squamous intraepithelial lesion or low-grade dysplasiaの略で、低異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当のものである。HSILはhigh-grade squamous intraepithelial lesion or high-grade dysplasiaで、高度異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当のものである。SCCはsquamous cell carcinomaの略で、扁平上皮癌である。そして、IFNはindefinite for neoplasiaの略で鑑別困難、細胞学的に腫瘍性あるいは非腫瘍性と断定しがたいものである⁹⁾。ただし、この判定区分は扁平上皮系細胞に対するもので、

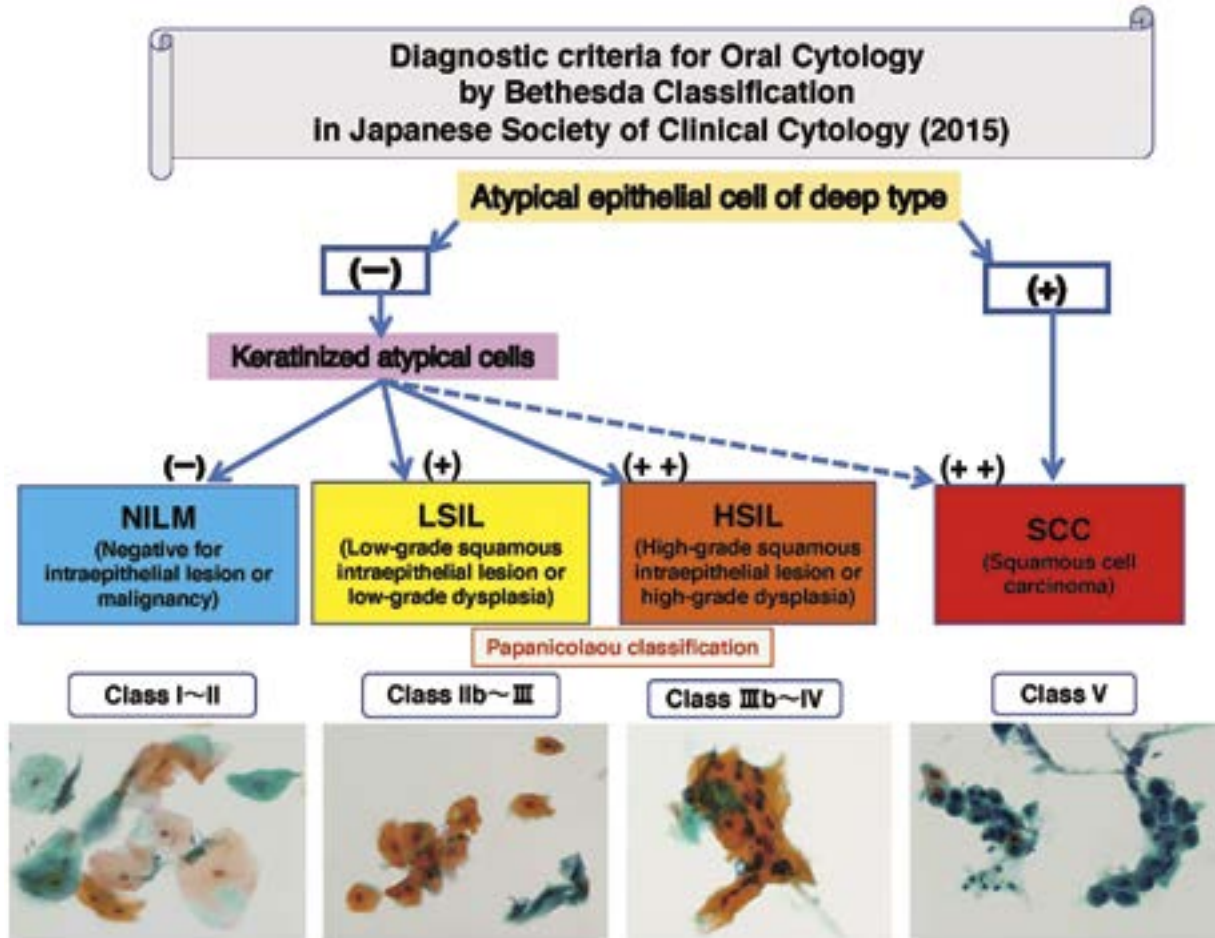


図5 ベセスダシステムによる口腔細胞診の診断基準（細胞診ガイドライン5 消化器 p24 改定より）

表2 ベセスダシステムと Papanicolaou 分類の比較

ベセスダシステム	Papanicolaou 分類
検体不適正 (Inadequate)	
検体適正 (Adequate)	
NILM (Negative for intraepithelial lesion or malignancy) 正常および反応性あるいは上皮内病変や悪性腫瘍変化がない	Class I ~ Class II
LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesion or low-grade dysplasia) 低異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当	Class IIb ~ Class III
HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesion or high-grade dysplasia) 高度異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当	Class IIIb ~ Class IV
SCC (Squamous cell carcinoma) 扁平上皮癌	Class V
IFN (Indefinite for neoplasia) 鑑別困難 (組織学的に腫瘍性あるいは非腫瘍性と断定し難い)	

腺上皮に由来する腫瘍や非上皮性腫瘍は別に扱う必要がある。

ところで、診断の判定が付いた症例に対しては、担当医・臨床医は以下のような対応を行います。

1) NILM の場合

およそ2-3週間の経過観察を行います。それでも患

者さんの病変部に変化や改善が見られなければ再検査または高次医療機関へ紹介となります。

2) LSIL/HSIL/SCC の場合

速やかに高次医療機関（大学病院等）に患者さんの紹介をお願いします。

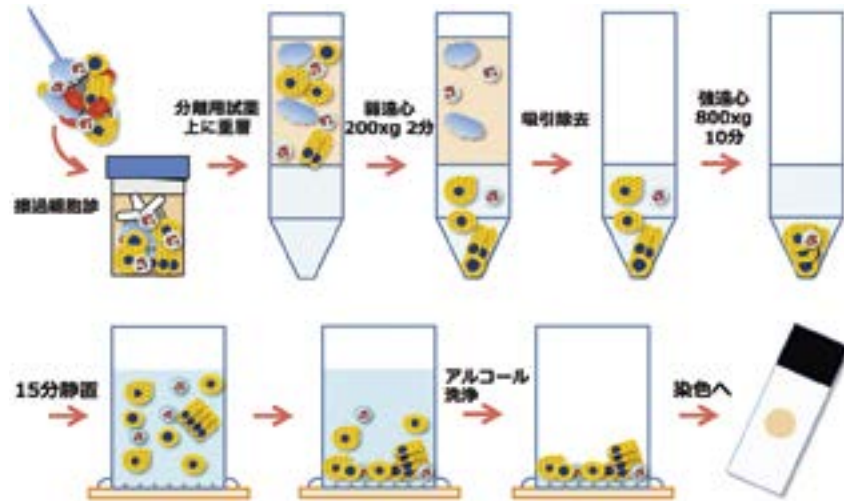
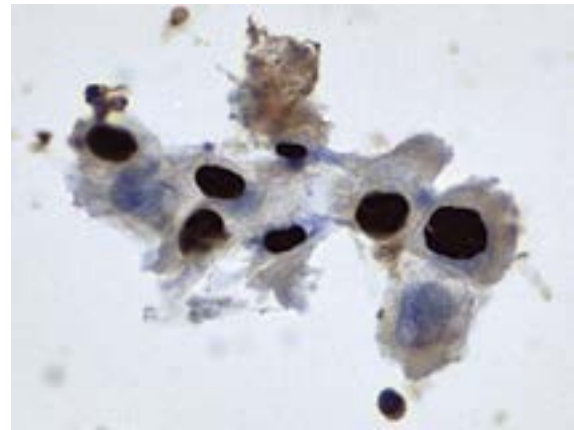


図6 LBC法（SurePath）による液状化検体標本作製の手順



図7 左：SCC症例のPapanicolaou染色



右：SCC症例のp53による免疫染色（x20）

【LBC法による標本作製】

ヒトの検体によりLBC法の標本作製した。研究室ではオーセックス® プラシ^{RT}（日本BD社、東京）で擦過して細胞を採取するSurePathTM保存液サイトリッチブルー（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA）を用いて標本作製する方法のである。免疫染色やRNAの抽出までを考えるとSurePath法を選択します（図6）。

【LBC法の免疫染色】

我々の病理診断科では、口腔の上皮性異形成および扁平上皮癌を疑う際には、組織診断だけでなく細胞診でも免疫染色を行なっている。現在、細胞診の免疫染色は以下のような方法で行なっている¹⁰⁾。スライドに細胞を貼付させて、15分エタノールで親水し、水洗を行い、TBS液に浸漬した。EDTA液で抗原賦活処理（圧力鍋）を行った後、3% H₂O₂ 10分間浸漬を行い、内因性ペルオキシター

ゼ活性阻害し、水道水の流水下で洗浄後、TBS液に浸漬した。1%BSA含むTBS液で希釈した1次抗体を常温120分または4℃オーバナイトで反応させる。そしてTBSで洗浄後、EnVison⁺を2次抗体に使用し、発色はDABを用い、核対比染色はマヤー・ヘマトキシリンで行った。水洗後、脱水および封入をして作製した（図7）。

【細胞診検体からのRNA抽出とReal-time PCR解析】

4本のバイアル中に保存されたヒト舌粘膜細胞（細胞診の診断名：NILM・LSIL・HSIL・SCC）をReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System（Promega Co, WI, USA）を用いてRNAの抽出を行った。抽出後RNAの質確認のために電気泳動を行った。抽出したRNA濃度（1 μg/μl以上）で泳動時の撮影ゲルの示す（図8）。Millennium Marker（0.5～9kb）を参考に28Sと18Sのバンドの位置は28Sで約4700bp、18Sは約1800bpに相当するので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^{10,11)}。

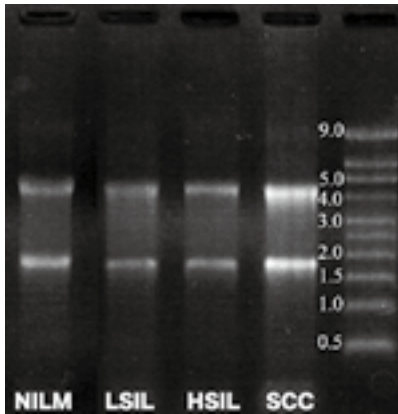


図8 ボトル抽出したRNAの泳動時ゲル

6検体およびコントロールより抽出した total RNA を用いて cDNA に変換し、リアルタイム PCR を $\Delta\Delta$ Ct 法により解析を行なった。p53 の相対発現量を細胞診のベセスダ分類に対応させた (図 9)。NILM で発現した p53 mRNA 量を 1 とした場合、LSIL では 4.20 倍、HSIL では 10.25 倍、SCC では 21.32 倍の平均の発現量を示した。p53 の mRNA 発現量は NILM と LSIL ($P < 0.05$)、HSIL ($P < 0.01$) ならびに SCC 間 ($P < 0.01$) で明らかな有意差を認めた。

【おわりに】

口腔細胞診における LBC 法を、様々な方法で比較検討を行った結果より以下の結論を得た。

- 1) LBC 法は、Papanicolaou 染色の標本は背景が鮮明であり、さらに免疫染色用標本を複数作製することが可能である。
- 2) 従来法は分子生物学的検索が不可能であるが、LBC 法のボトルからは DNA・RNA の抽出は容易で、量的・質的にも十分であるために多くの遺伝子解析の検索が可能である。

したがって、LBC 法は従来法と比べて、様々な解析方法に応用が可能であること、今後の口腔がん検診への利用も期待されることが示唆された。

【参考文献】

- 1) 国立がん研究センターがん情報サービス：最新のがん統計。
(http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)
- 2) El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ: WHO Classification of Head and Neck Tumours 4th ed, p105-131, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2017.
- 3) 松坂賢一：口腔がんの病理学的考察と病理検査。

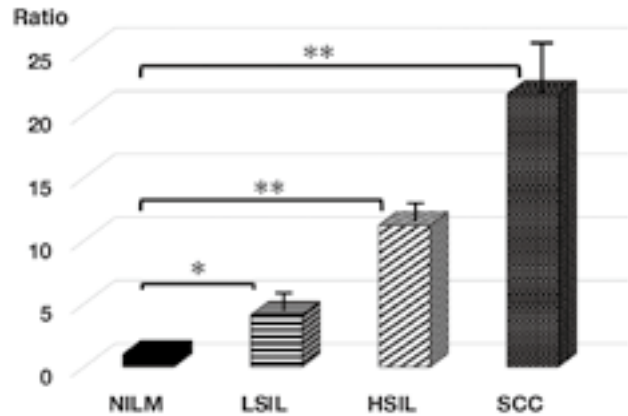


図9 p53 の RT-PCR の解析結果 (* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$)

日歯科医師誌, 69 : 199-206, 2016.

- 4) 松坂賢一：口腔細胞診の現状. 歯科学報, 117(2) : 87-92, 2017.
- 5) 井村穰二, 内田好明, 富田茂樹, 市川一仁, 藤盛孝博：特集細胞診の進歩液状化細胞診 (Liquid Based Cytology) の現状と今後. 病理と臨床, 27 : 1144-1151, 2009.
- 6) Navone R, Burio P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, Gandolfo S : The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. Cytopathology, 18 : 356-360, 2007.
- 7) Yano H, Matsuzaka K, Sakamoto M, Murakami S, Hata N, Hashimoto K, Yakushiji T, Kaneko M, Hanazawa Y, Tanzawa H, Katakura A, Shibahara T, Inoue T : Clinical statistical study of exfoliative cytology performed during oral cancer screening in Chiba city in the past 11 years. 日口腔検会誌, 8 : 33-38, 2016.
- 8) Matsuzaka K, Hashimoto K, Nakajima K, Horikawa T, Kokubun K, Yano H, Sakamoto M, Murakami S, Yakushiji T, Kasahara K, Katakura A, Shibahara T, Hashimoto S, Inoue T : Morphological analysis of relationship between oral cytology and biopsy in diagnoses of leukoplakia or oral lichen planus. 日本口腔検査学会雑誌, 8 : 22-28, 2016.
- 9) 細胞診ガイドライン 5 消化器 2015 年版口腔/唾液腺/消化管/肝胆道系/脾臓 (日本臨床細胞学会編), p18-79, 金原出版, 東京, 2016.
- 10) 田沼順一：口腔の液状化検体細胞診の可能性. BD Oral Cytology Report, 1 : 1-2, 2018.
- 11) 田沼順一：口腔のがんを疑ったら - 液状化検体細胞診で早めに検査をしませんか -, BD Oral Cytology Report, 2 : 1-2, 2019.