

CINtec® PLUS 検査ガイド



もう細胞診異常を見逃さない

独自の二重バイオマーカーにより、
HPV感染により発癌性へと繋がる形質転換を
確実にトリアージします。

The science that creates certainty.



目次

はじめに	4
p16およびKi-67と、癌化におけるその役割	5
発癌性形質転換におけるp16の役割	5
発癌性形質転換におけるKi-67の役割	7
検査ガイドの目的	9
CINtec® PLUS Cytologyの臨床的評価	10
子宮頸部上皮細胞におけるCINtec® PLUS Cytology陽性の判定基準	11
CINtec® PLUS Cytology陰性の判定基準	11
スクリーニングの手順	20
CINtec® PLUS Cytologyの細胞集塊判定フローチャート	22
標本の適正評価	33
陽性コントロールと陰性コントロール	33
陽性コントロール	33
陰性コントロール	33
非特異的なバックグラウンド染色とアーチファクト	34
非特異的な茶色のバックグラウンド染色	35
非特異的な赤色のバックグラウンド染色	39
特異的および非特異的なKi-67の核染色性を判別するための基準	39
茶色および赤色の非特異的なバックグラウンド染色の例	45
非特異的なバックグラウンド染色の評価	47
バックグラウンド染色が認められた際の適性の定義	47
赤色発色基質のブリーディング(滲み)	48
細胞外成分への非特異反応	49
細胞外成分の非特異反応による不明瞭化	49
非特異的なバックグラウンド染色と細胞外成分への非特異的な染色の違い	54
標本作製時におけるアーチファクト	54
判定が困難な症例	57
確認テスト	67
確認テストの解答	75
参考文献	82



はじめに

ヒトパピローマウイルス(HPV)感染は、極めてよく見られますが、ほとんどが一過性であり、実際に高度病変や癌に進行するのはHPV感染した内の10%未満です。^{1, 2, 3} そのため、精密検査(細胞診再検査、コルボスコピー、生検など)を受けた女性の多くは重篤な前癌病変が認められず、不必要な検査を受けたことになります。⁴ HPV検査は、細胞診検査に比べて高度前癌病変を検出する感度が高いことは報告されています。^{5, 6, 7, 8, 9} 子宮頸部腫瘍において、HPV感染により引き起こされた細胞周期異常の解明が進んだことにより、子宮頸部前癌病変のリスクが高い女性を選別するため、バイオマーカーが使用されるようになりました。タンパクの発現異常は、実際に細胞が腫瘍化していることを示しており、バイオマーカーはハイリスク型HPV検査の特異度を向上させるために役立ちます。⁴

HPV感染により形質転換した子宮頸部前癌病変のバイオマーカーであるp16INK4a蛋白(p16)の過剰発現を検出することは、細胞診で意義不明な異型扁平上皮細胞(ASC-US)または軽度扁平上皮内病変(LSIL)やHPV陽性者を効果的にトリアージするためのツールであることが示されています。^{10, 11, 12, 13} 近年、いくつかの研究で、細胞周期異常の特徴として同一細胞内でp16とKi-67を同時に検出する、新しい二重細胞診免疫染色法の診断精度が報告されています。^{14, 15, 16, 17} 正常細胞では、p16とKi-67の発現は相互排他的です。形態に依存しないp16/Ki-67の二重細胞診免疫染色検査は、ASC-USおよびLSILトリアージや、細胞診陰性だがHPVスクリーニング検査が陽性であった女性において、HPV検査と比較して同程度の感度と有意に高い特異度を有することが示されました。^{14, 15}

子宮頸部病変のスクリーニングには、さまざまな新しいアプローチがありますが、標準化され臨床で広く使用されているものはわずかです。スクリーニングプログラムが細胞診単独検査からシフトする方向へ進んでいることや、HPVワクチンの導入に伴い、利用できる幅広いテクノロジーを理解していくことが重要になっています。HPVワクチン接種プログラムの拡大により、HPVプライマリー検査やp16/Ki-67二重細胞診免疫染色検査などの、より客観的な検査法への移行が求められることになります。ワクチン接種集団における子宮頸部病変の有病率が低下するにつれて、子宮頸癌の発症リスクが高い患者をより正確に選別するために、客観的な遺伝子検査やバイオマーカーによる検査が極めて重要になります。

ロシュは、ハイリスク型HPV感染により癌化が認められた細胞を特定し、高度子宮頸部病変を有する女性を選別する、CINtec® PLUS Cytologyを開発しました。FDA承認を受けているコバスHPVテストによるHPVプライマリースクリーニングのトリアージとしてCINtec® PLUS Cytologyを使用した場合、CINtec® PLUS Cytologyは、ハイリスク型HPV感染により正常細胞周期を逸脱した細胞を特定し、HPV感染により形質転換した細胞の存在を裏付けます。CINtec® PLUS Cytologyは、子宮頸部前癌病変を有する可能性が最も高い女性を正確に選別し、それによって直にコルボスコピーが必要か否かを判断する助けとなります。

CINtec® PLUS Cytologyでは、以下のような特徴を持つ、同一細胞内におけるp16とKi-67を同時検出します。

- 正常細胞周期からの逸脱を示す指標となる
- HPV感染による癌化と相関する
- 高度子宮頸部病変を有する可能性が高い女性を選別する客観的指標となる

子宮頸部細胞におけるp16とKi-67が同時に発現していることを確認することにより、直にコルポスコピーが必要となる可能性が最も高い女性を選別します。¹⁹

■ p16およびKi-67と、癌化におけるその役割

子宮頸癌の発生過程において細胞変化の大半は、子宮頸部の移行帯(SCJ)で起こります。子宮頸部扁平上皮の正常な成熟では、細胞増殖は基底細胞層に限定されています。

■ 発癌性形質転換における p16 の役割

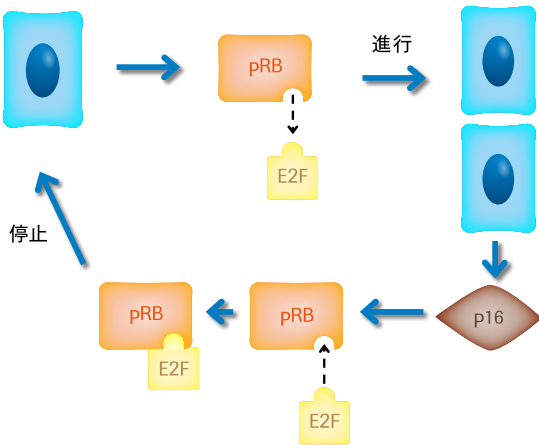
正常細胞では、癌抑制タンパクである網膜芽細胞腫タンパク(pRB)が転写因子であるE2Fに結合し、細胞周期の進行および増殖を促進する遺伝子の転写を遮断します。その結果、細胞周期が停止します。pRBからE2Fが遊離されると、細胞周期の進行／増殖につながります。

細胞分裂後、p16遺伝子が活性化され、p16タンパクが発現します。p16タンパクは、E2FとpRBの再結合を促進することにより、細胞周期を抑制します。E2FとpRBが再結合すると、細胞は細胞周期停止状態となります。このフィードバック制御機構は、細胞周期の進行と細胞周期の抑制のバランスを維持するのに極めて重要です。²⁰

正常な子宮頸部扁平上皮細胞では、このフィードバック機構が細胞周期の進行と細胞周期抑制の正常なバランスの維持に貢献しています。

図1.0

正常細胞周期におけるpRB、E2Fおよびp16の機能



HPVウイルスは子宮頸癌を引き起こすことが知られています。HPVには性交渉によって感染し、子宮頸部に入ったHPVウイルスは子宮頸部の移行帯の上皮細胞に感染することがあります。HPV感染のほとんどは一過性であり、自己免疫によって6~12ヵ月以内に排除されます。ハイリスク型HPV感染により形質転換した場合、ウイルス由来のE7がE2Fと競合してpRBに結合します。pRB:E7複合体は、pRBを不活性化させ、p16発現に対するpRBの負のフィードバック機構を攪乱します。p16の過剰発現が続く、細胞が増殖し続けます。このp16タンパクの過剰発現は、免疫組織化学染色(IHC)によって検出することが可能で、子宮頸部組織におけるHPV感染による細胞の癌化を示す指標となります。¹⁹

図1.1

発癌性形質転換におけるpRB、E2Fおよびp16の機能

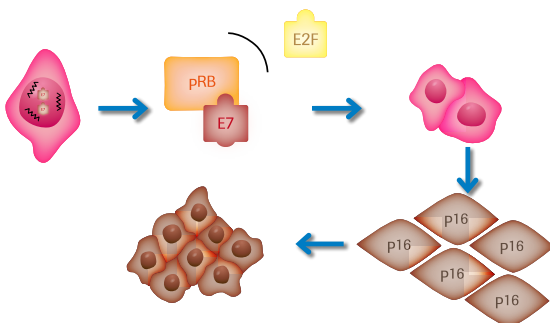
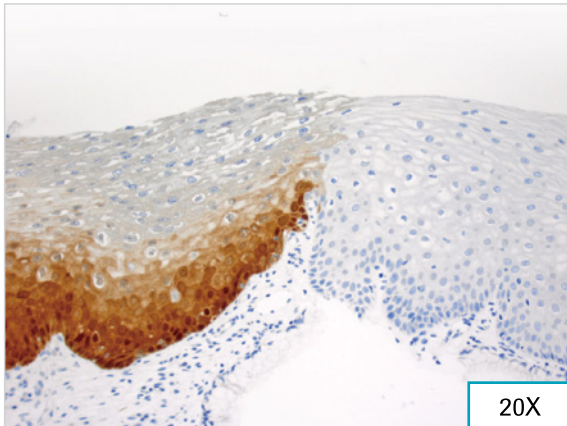


図1.2のように、p16の過剰発現は、p16免疫組織化学染色(IHC)によって検出することができます。子宮頸部組織のIHC染色は、上皮の基底細胞層から傍基底細胞層へと連続的なびまん性の染色を特徴とします。これはHPV感染による子宮頸部病変があることを示します。

図1.2

p16免疫染色陽性例：

— 子宮頸部扁平上皮にびまん性の染色像(Diffuseパターン)

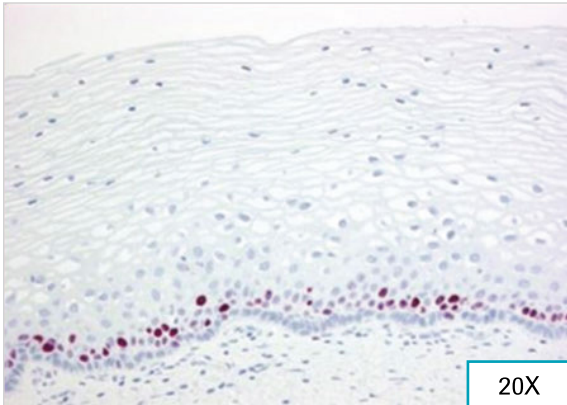


発癌性形質転換におけるKi-67の役割

Ki-67タンパクは、細胞周期のさまざまな過程で発現しており、活発な細胞増殖を示すマーカーの一つです。図1.3に示すように、正常な子宮頸部扁平上皮組織では、Ki-67の発現は増殖が活発な傍基底細胞層に限定されています。Ki-67陽性像は、核が赤く染色されます。注意点として、正常な子宮頸部扁平上皮の中層および表層細胞は染色されません。これらの内細胞は最終分化した細胞であり、それ以上活発な増殖能はありません。正常細胞では、p16とKi-67の発現は相互排他的です。¹⁹

**図1.3**

Ki-67免疫染色(正常子宮頸部扁平上皮)



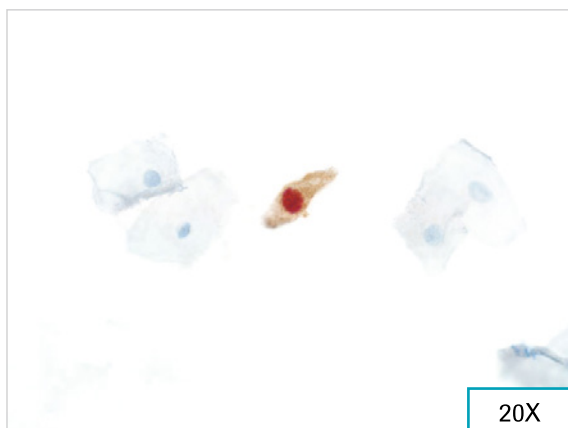
p16とKi-67の免疫染色を併用することが、子宮頸部の細胞診標本を評価するうえで重要になります。細胞診標本では、子宮頸部組織の形態学的特徴や構造を確認することはできません。したがって、細胞診標本では補足して客観的指標であるp16/Ki-67の二重染色で確認することは、HPV感染により発癌性形質転換したかどうかを特定するうえで極めて重要です。同一細胞内におけるp16とKi-67の共局在は、正常細胞周期からの逸脱を明確に示しています。したがって、p16/Ki-67の同時発現は、HPVの持続感染により細胞が癌化した可能性を示しています。

CINtec® PLUS Cytologyは、HPVの遺伝子型、患者の年齢または形態学的評価に依存せず、患者を適切に層別化し、高度子宮頸部病変を選別することができます。^{20, 21}

図1.4

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

— p16(細胞質:茶)およびKi-67(核:赤)により二重染色された扁平上皮細胞



検査ガイドの目的

CINtec® PLUS Cytologyの検査ガイドは、以下を目的としています。

- 細胞検査士や病理医、細胞診専門医らに対し、CINtec® PLUS Cytologyの臨床的な判定に役立つ情報を提供
- CINtec® PLUS Cytologyを判定をするための推奨判定法の説明
- CINtec® PLUS Cytologyで染色された子宮頸部検体の染色像を提示
- 細胞検査士や病理医、細胞診専門医らに対し、非特異的なバックグラウンド染色が認められた場合など、さまざまな陽性および陰性例を示して、判定困難な例を提示
- 自動免疫装置であるベンチマーク ULTRAでCINtec® PLUS Cytologyを染色する際、精度管理用コントロールとして既知のCINtec® PLUS Cytology陽性検体を陽性コントロールとして使用するうえでのガイダンス



CINtec® PLUS Cytologyの臨床的評価

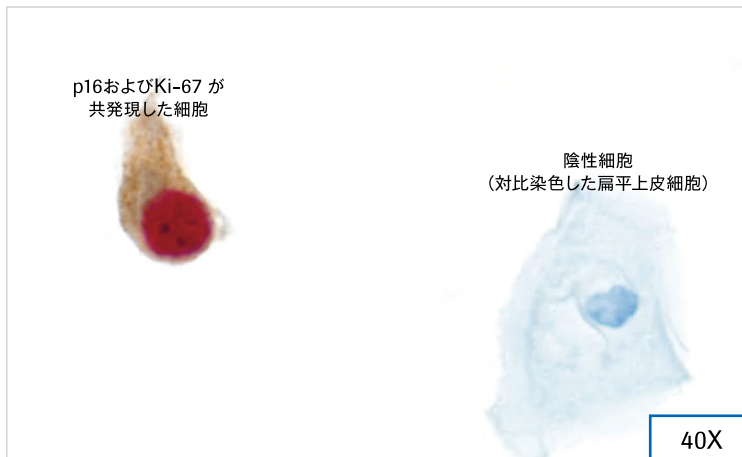
CINtec® PLUS Cytologyは、ヒトp16蛋白を標的とするマウスモノクローナル抗体と、ヒトKi-67蛋白を標的とする遺伝子組換え型ウサギモノクローナル抗体を1次抗体とする免疫細胞化学染色です。CINtec® PLUS Cytologyの検出試薬は、ベンタナ OptiViewの検出試薬と類似しています。p16の検出は、DAB(茶色)で発色させます。p16は、細胞質と核に認められる場合と、細胞質のみに認められる場合があります。Ki-67は、核や核小体のみに認められます。Ki-67の検出は、ファーストレッドで発色させます。対比染色にはヘマトキシリンを使用し、非反応性の細胞質や核を青色に染色します。細胞質や核にp16やKi-67が認められない表層扁平上皮細胞は、特異的なp16およびKi-67が認められない他の細胞の染色強度を比較するための「コントロール」として用いられます。

図2.0

(左)CINtec® PLUS Cytology陽性の細胞、

(右)p16(茶色)およびKi-67(赤色)の発現が認められる

他の細胞との対比・比較として用いられる。対比染色した中層扁平上皮細胞



子宮頸部上皮細胞におけるCINtec® PLUS Cytology陽性の判定基準

- CINtec® PLUS Cytologyの判定は、細胞形態学的判定に依存しない
- 細胞質が茶色(p16)、核が赤色(Ki-67)に染色されている
- p16(茶色)とKi-67(赤色)が同一細胞内に共発現している
 - ・赤色が認められた核と茶色が認められた細胞質は、顕微鏡下の同一焦点面上になければならない
- 染色強度は弱～強の場合がある
- 特異的なKi-67の発現(赤)は、細胞核内が均一に染色される場合と、以下のように部分的に染色される場合がある
 - ・点状または顆粒状の染色パターン
 - ・核小体の赤染色
- 共発現が認められる子宮頸部上皮細胞が1個でもあれば陽性と判定する

CINtec® PLUS Cytology陰性の判定基準

- 青色に対比染色された子宮頸部上皮細胞しか認められない
- p16(細胞質や核の茶染色)が発現した子宮頸部上皮細胞しか認められない
- Ki-67(核の赤染色)が発現した子宮頸部上皮細胞しか認められない

染色結果を陽性と判定するには、同一子宮頸部上皮細胞内でp16とKi-67が共発現している必要があります。

対比染色は青色であり、p16およびKi-67染色が認められない子宮頸部上皮細胞や、Ki-67のみが認められる細胞が染色されます。

注意: 日光(太陽)または白色光に設定したハロゲンまたはLED光源の顕微鏡と、黄味光を排除するため、ニュートラルカラーバランス(NCB)フィルターまたは色温度変換(LBD)フィルターの使用が推奨されます。また、減光(ND)フィルターを使用してもよく、使用することにより白色光の視野が得られ、核に認められる赤色のKi-67の発現と、核および細胞質に認められる茶色のp16の発現を区別するうえで有用です。

判定	染色像
CINtec® PLUS Cytology陽性 (図2.1参照)	<p>少なくともp16とKi-67が共発現した子宮頸部上皮細胞1個が認められる。</p> <p>共発現した子宮頸部上皮細胞は、シート状集塊、重積集塊または孤立した集塊で認められる場合がある。</p>
CINtec® PLUS Cytology陰性 (図2.2参照)	<p>子宮頸部上皮細胞に認められる染色が以下の場合</p> <ul style="list-style-type: none"> - p16のみ発現(核や細胞質) - Ki-67のみ発現(核) - 青色の対比染色のみ

図2.1

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

単体で出現したp16およびKi-67が共発現した細胞を認める

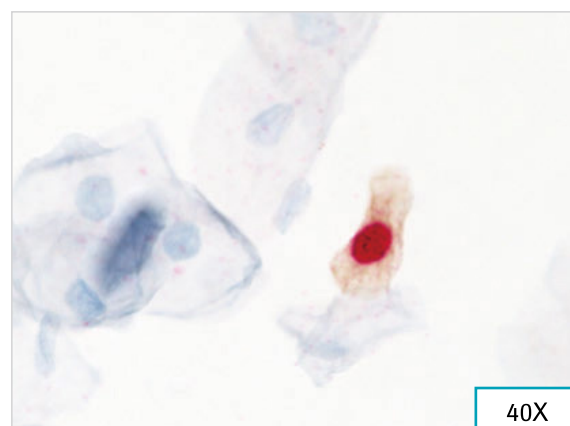
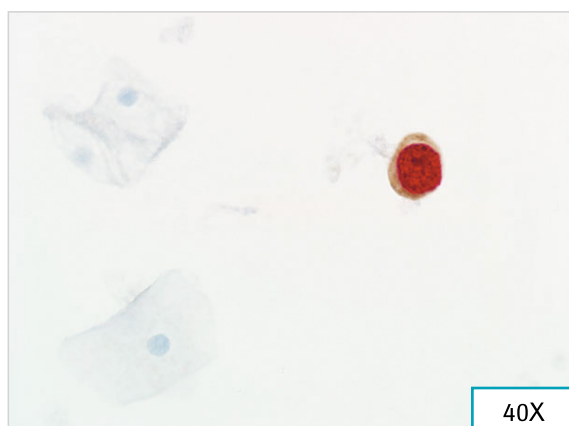
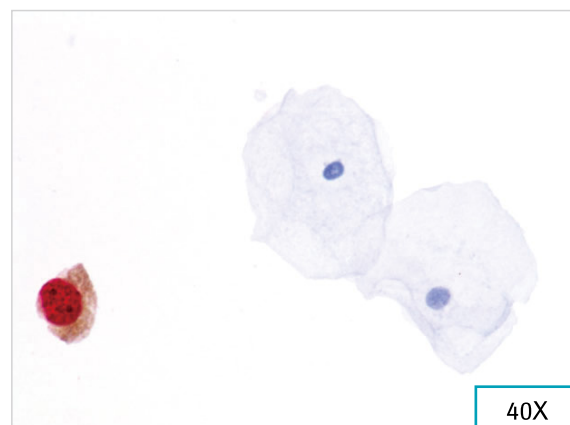


図2.1(続き)

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

p16の強発現が認められる単一細胞(丸で囲んだ部分)。顕微鏡の視野を明るくすると、赤色の核染色が観察しやすくなる

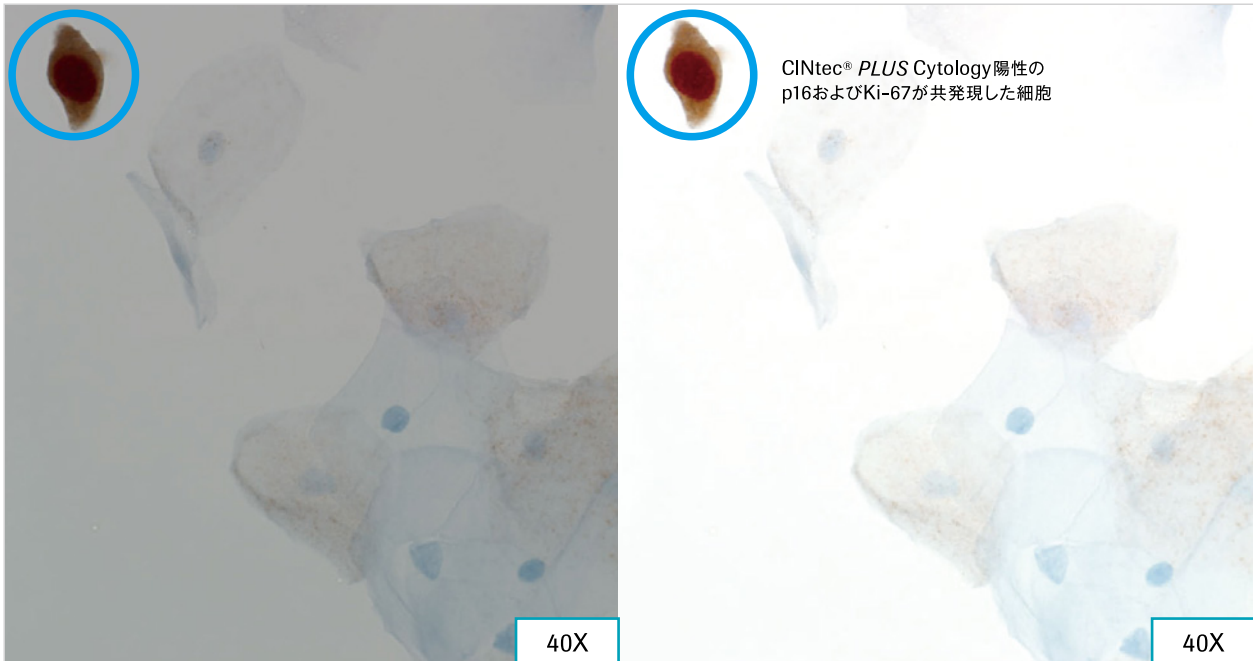


図2.1(続き)

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

細胞質にp16発現、核にKi-67発現が認められる単一の細胞で、p16およびKi-67 が共発現した細胞



図2.1(続き)

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

p16およびKi-67が共発現した細胞を含む細胞集塊

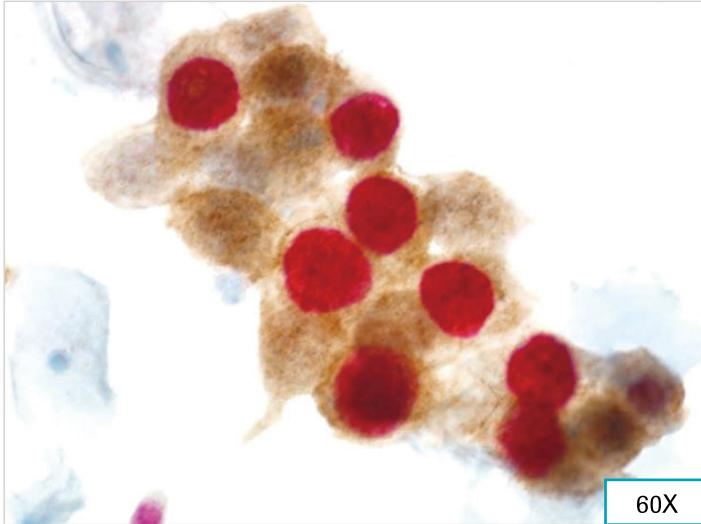
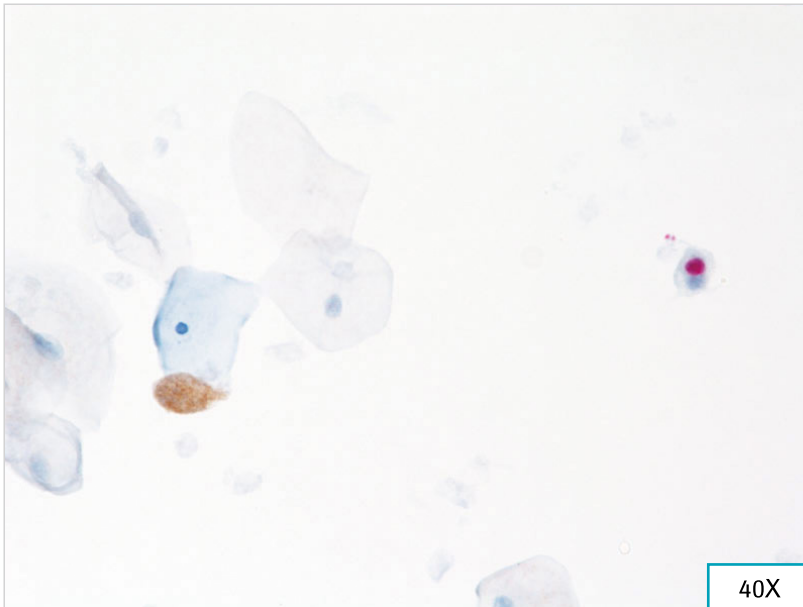


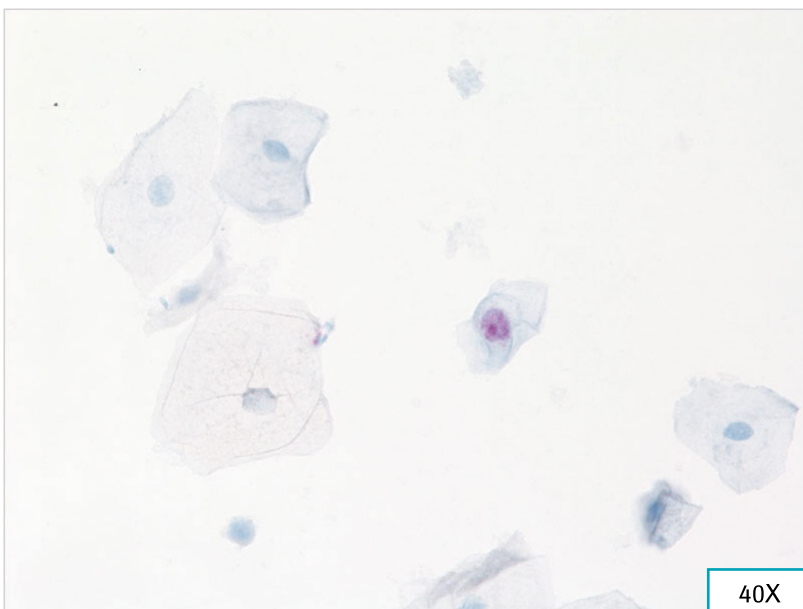
図2.2

CINtec® PLUS Cytology陰性例:

p16またはKi-67のいずれかの発現が認められる。以下の画像には共発現した細胞は認められない



左側の扁平上皮化生細胞にはp16の発現のみが認められ、右側の扁平上皮化生細胞は核のKi-67の発現のみが認められる。いずれの細胞もCINtec® PLUS Cytology陰性である。右側の化生細胞の細胞質には、青色の対比染色が確認される。

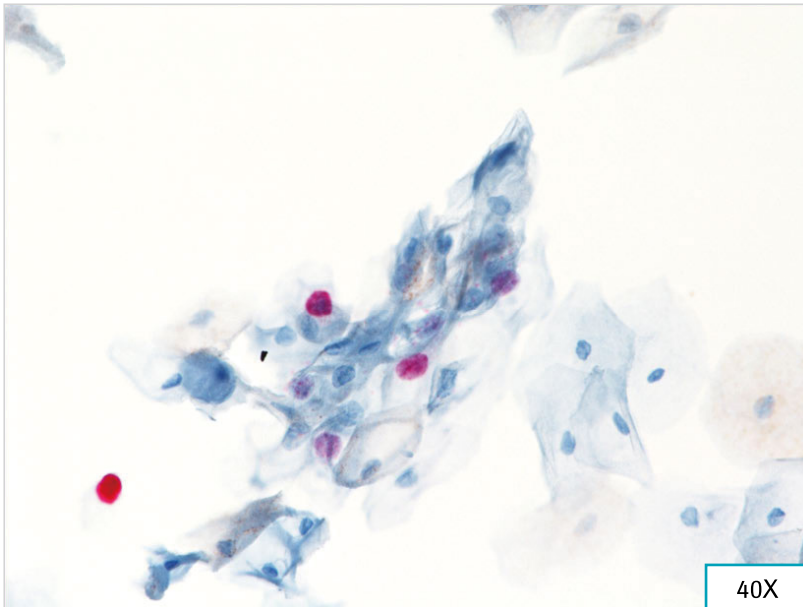


核に弱いKi-67の発現が認められる、CINtec® PLUS Cytology陰性の扁平上皮細胞

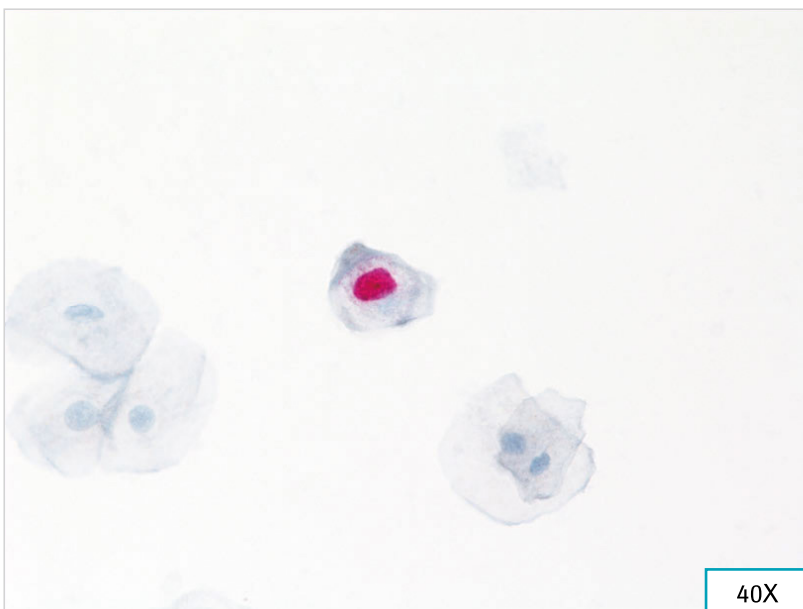
図2.2(続き)

CINtec® PLUS Cytology陰性例:

p16またはKi-67の発現が認められる。以下の画像にはp16およびKi-67の共発現した細胞は認められない



核にKi-67発現が認められる、CINtec® PLUS Cytology陰性の扁平上皮細胞

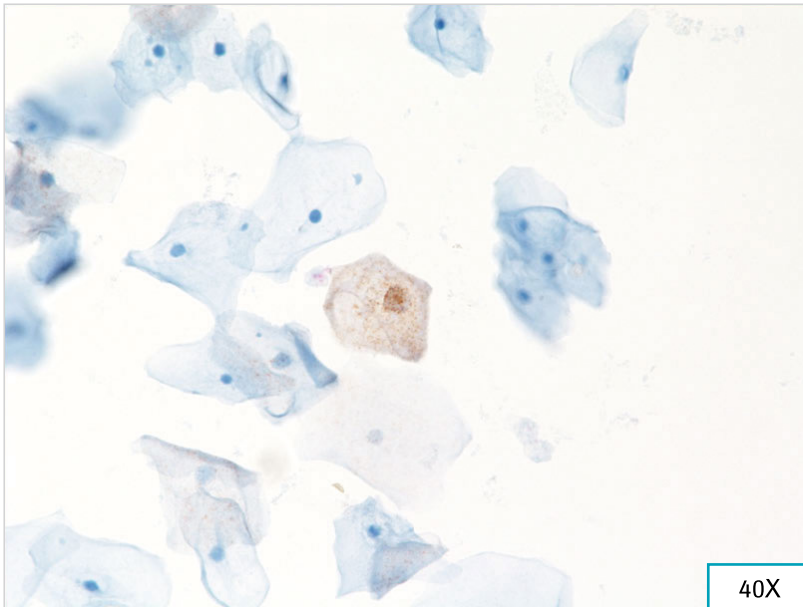


核にKi-67発現が認められる、CINtec® PLUS Cytology陰性の扁平上皮細胞

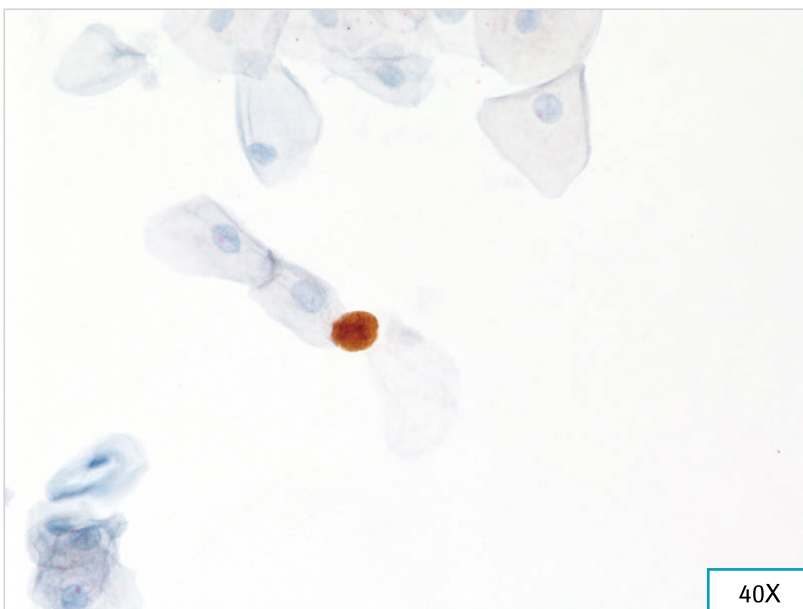
図2.2(続き)

CINtec® PLUS Cytology陰性例:

p16またはKi-67の発現が認められる。以下の画像にはp16およびKi-67が共発現した細胞は認められない



核と細胞質にp16発現が認められる、CINtec® PLUS Cytology陰性の扁平上皮細胞

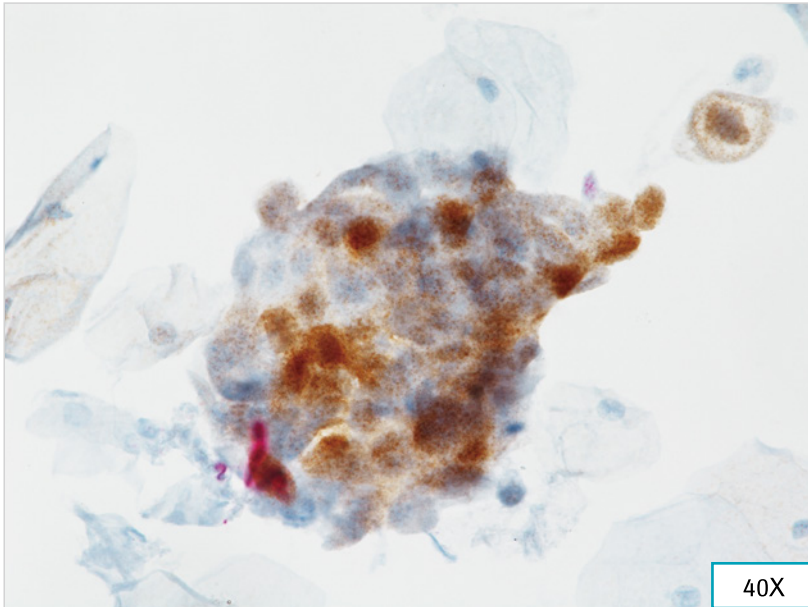


核と細胞質にp16発現が認められる、CINtec® PLUS Cytology陰性の扁平上皮化生細胞

図2.2(続き)

CINtec® PLUS Cytology陰性例:

p16またはKi-67発現が認められる。以下の画像にはp16およびKi-67の共発現した細胞は認められない

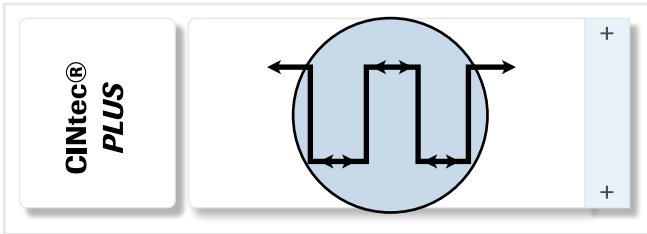


p16およびKi-67の共発現した細胞が認められない、CINtec® PLUS Cytology陰性の扁平上皮化生細胞または頸管細胞集塊



スクリーニングの手順

CINtec® PLUS Cytologyを用いて染色したスライドを対物10倍または20倍でスクリーニングします。



孤立または単一で出現している細胞の判定は最も容易です。

- p16(茶色)の染色が濃い場合は、Ki-67(赤色)の核の染色の有無を確認するために顕微鏡の視野を明るくする必要があります。
- 孤立したp16およびKi-67の共発現した細胞を認めた場合は、染色された核と細胞質が確実に同一細胞のものであること、すなわち細胞質と核が同一焦点面上にあること(赤色に染色された核が上や下にのっていない)を確認する必要があります。

p16の茶色い染色が強いため核や細胞質の色が濃く見え、特異的な赤色のKi-67の染色性を評価することが難しい場合は、顕微鏡の視野を明るくすると、核に赤色の染色が認められるかどうか評価しやすくなります。

特異的なp16(茶色)およびKi-67(赤色)の発現が認められる細胞集塊は、以下の細胞集塊判定アルゴリズムに従って評価してください。

Step 1. 集塊辺縁部に共発現した細胞がないか確認する

- ある場合 → 結果は陽性と判定
- ない場合 → ステップ2へ進む

Step 2. 集塊のp16の染色性がびまん性*か、または限局性^かを評価する

- 限局性の場合:この陰性細胞集塊について、さらなる評価は不要
- びまん性の場合:ステップ3へ進む

Step 3. Ki-67が発現している赤色の核が上下に重なっているのか、または細胞質内に内包されているかを評価する(微動ハンドルを用いて焦点を調節する)

- Ki-67が発現した(赤色)核が上下に重なっていた場合 → 更なる評価は不要であり、結果は陰性と判定
- Ki-67が発現した(赤色)核が細胞質内に内包されていた場合 → 共発現した細胞が存在し、結果は陽性と判定

* 集塊内におけるびまん性のp16の染色像は、すべての細胞が連続的または完全に染色されていると定義される

^ 集塊内における限局性のp16の染色像は、細胞が断続的または不完全に染色されていると定義される

CINtec® PLUS Cytology 細胞集塊判定フローチャート

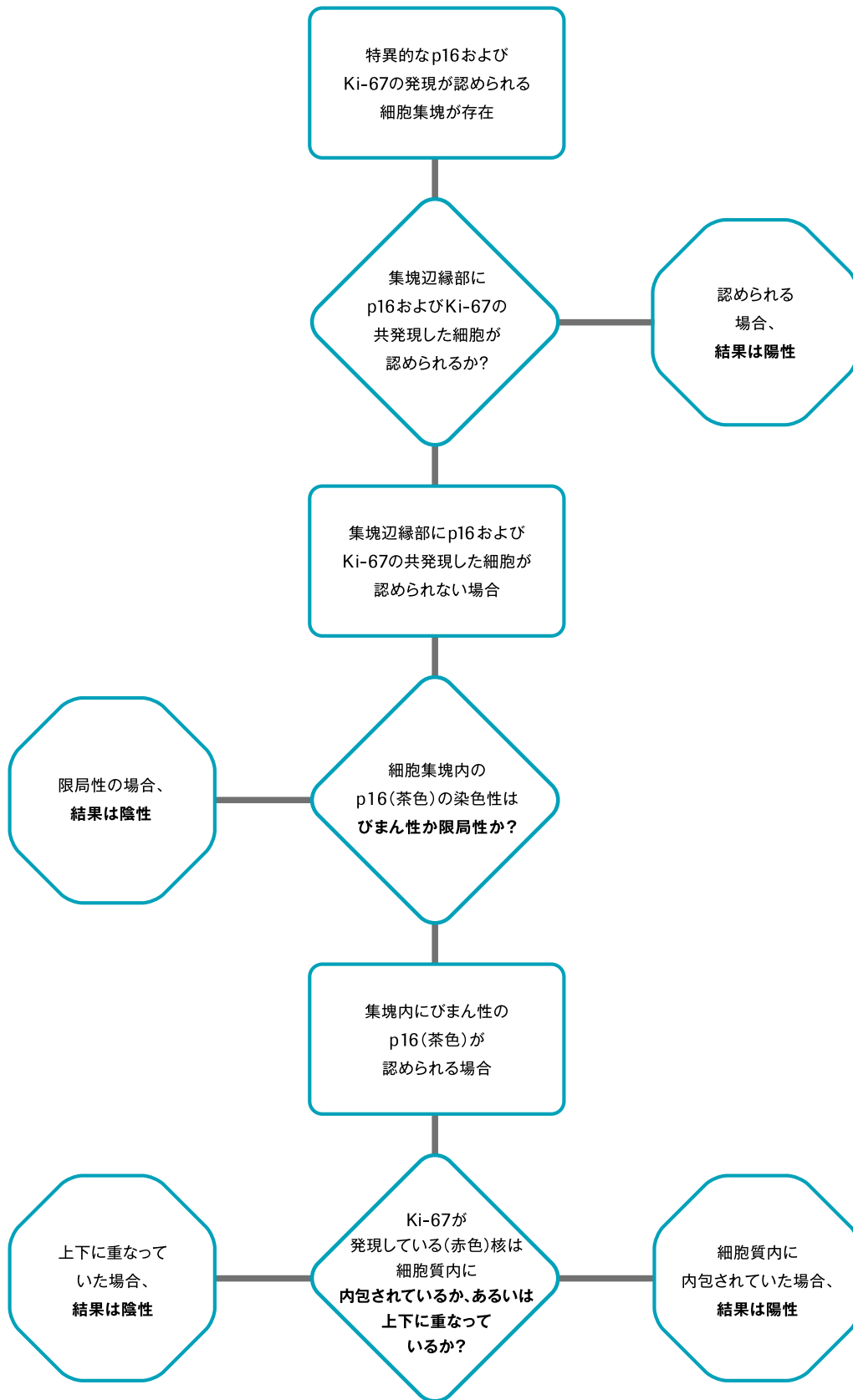
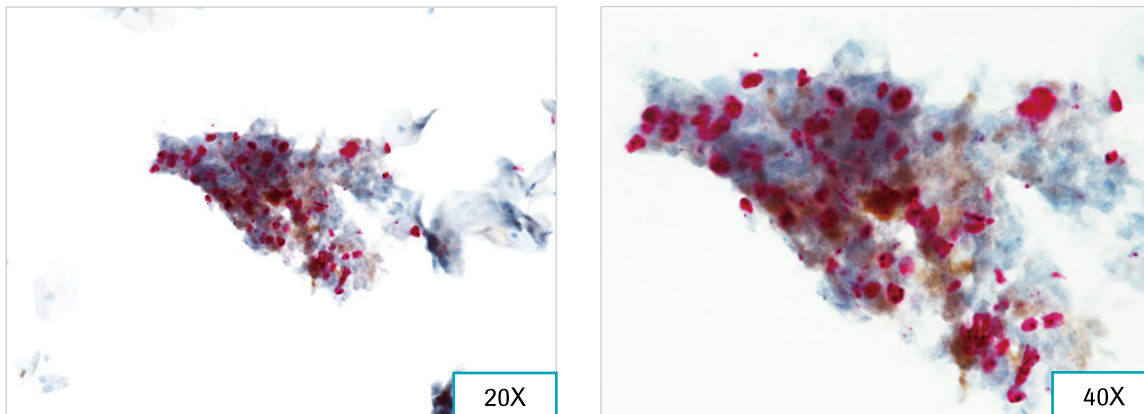


図2.3

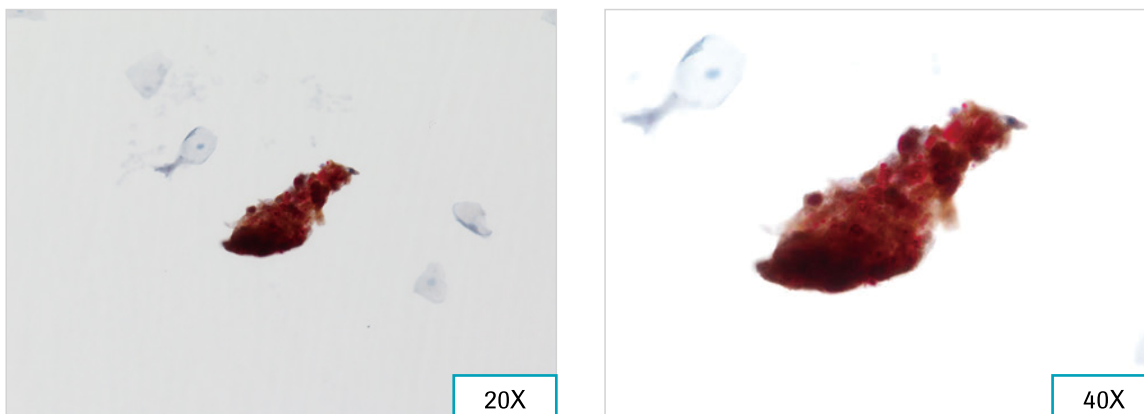
細胞集塊におけるp16およびKi-67判定例：

CINtec® PLUS Cytologyの細胞集塊判定フローチャートに従って染色結果を評価



CINtec® PLUS Cytology陰性の細胞集塊：

集塊辺縁部に二重染色された細胞は認められず、限局性のp16の発現と核にKi-67の発現は認められるが共発現した細胞は認められない。

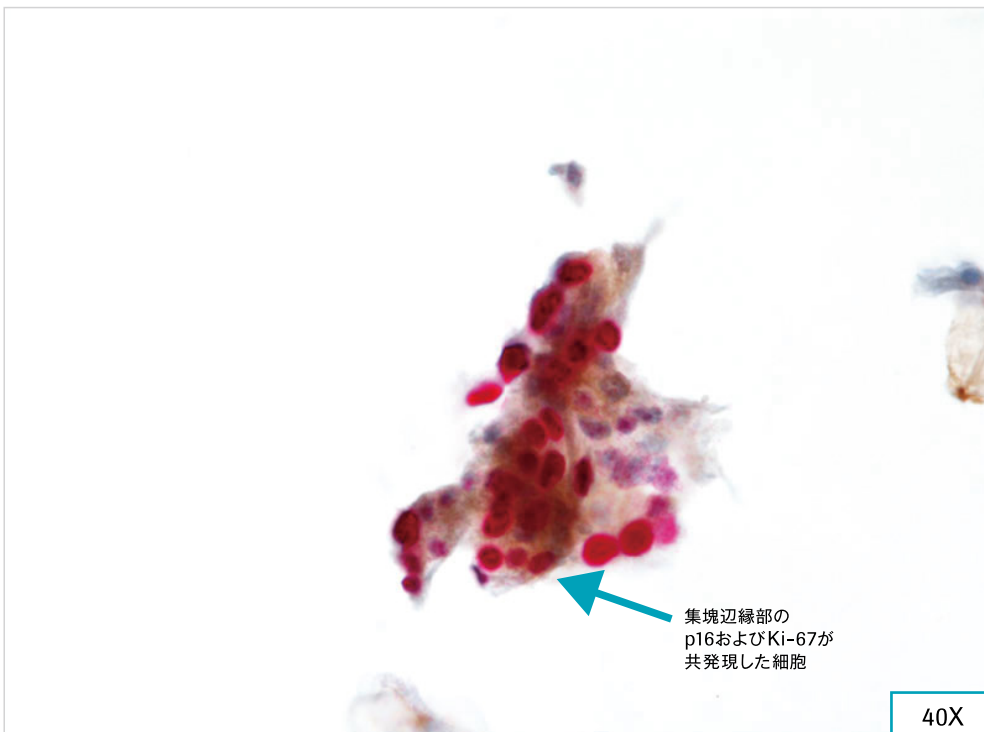
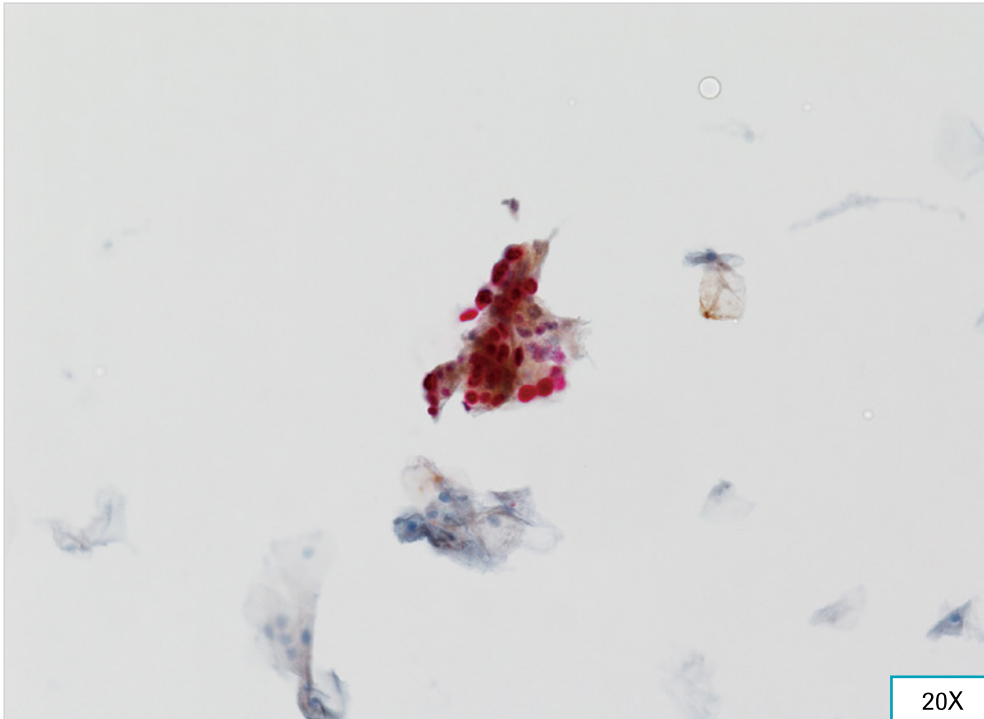


CINtec® PLUS Cytology陽性の細胞集塊：

細胞集塊辺縁部に二重染色された細胞を明確に特定することは難しいが、びまん性のp16の発現が認められ、内包されている核にはKi-67の発現が認められる。

図2.3(続き)

細胞集塊におけるp16およびKi-67判定例

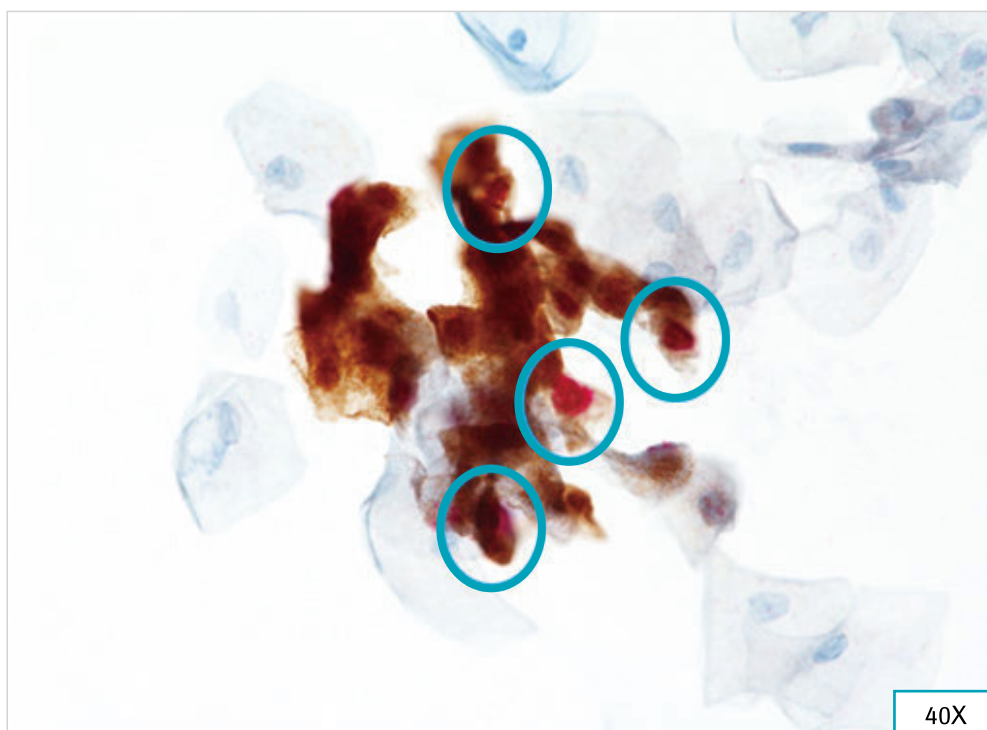
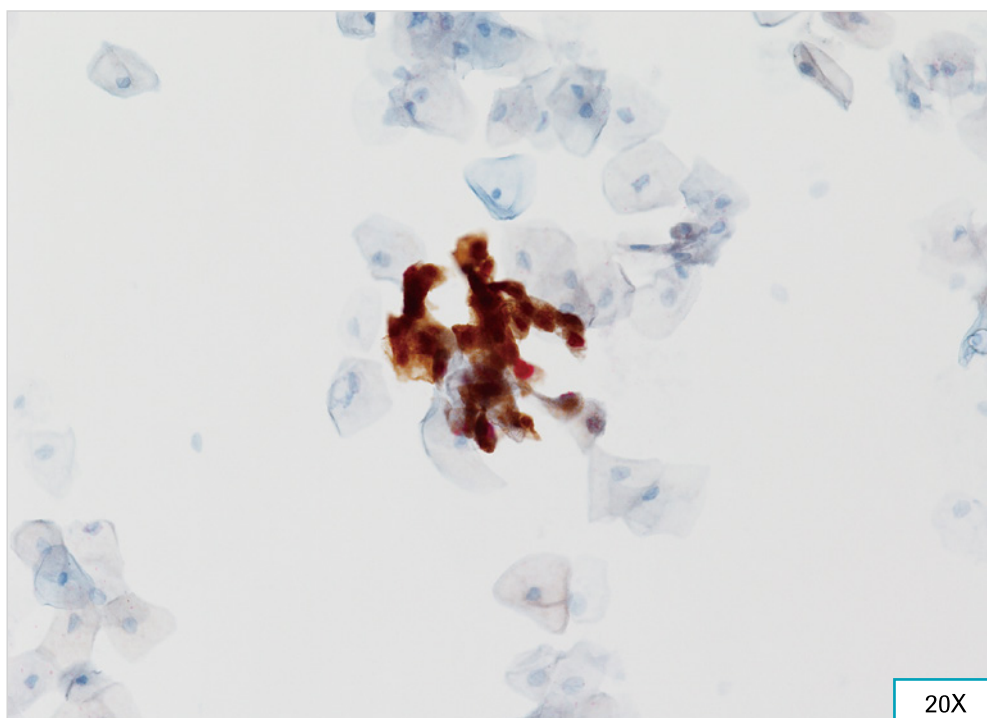


CINtec® PLUS Cytology陽性例:

集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる、細胞集塊。また、この細胞集塊にはびまん性のp16の発現が認められ、内包されている核にはKi-67の発現が認められることから、染色結果が陽性であることが裏付けられる。

図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67の発現の判定例



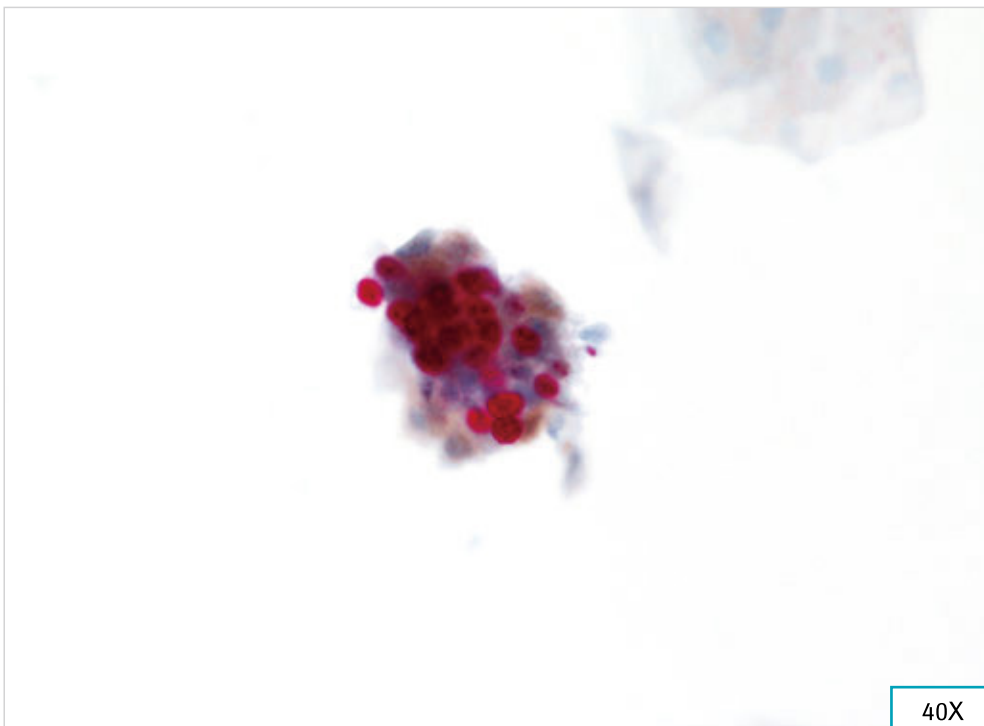
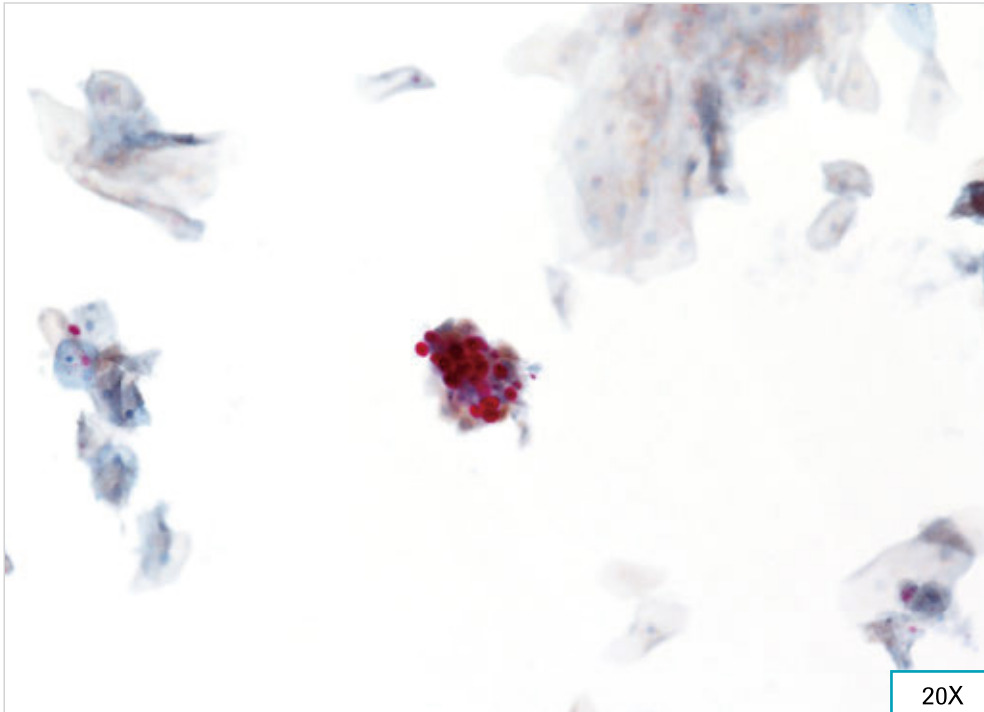
CINtec® PLUS Cytology陽性例:

集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる細胞集塊。

この細胞集塊には、びまん性のp16の発現も認められる。

図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67判定例

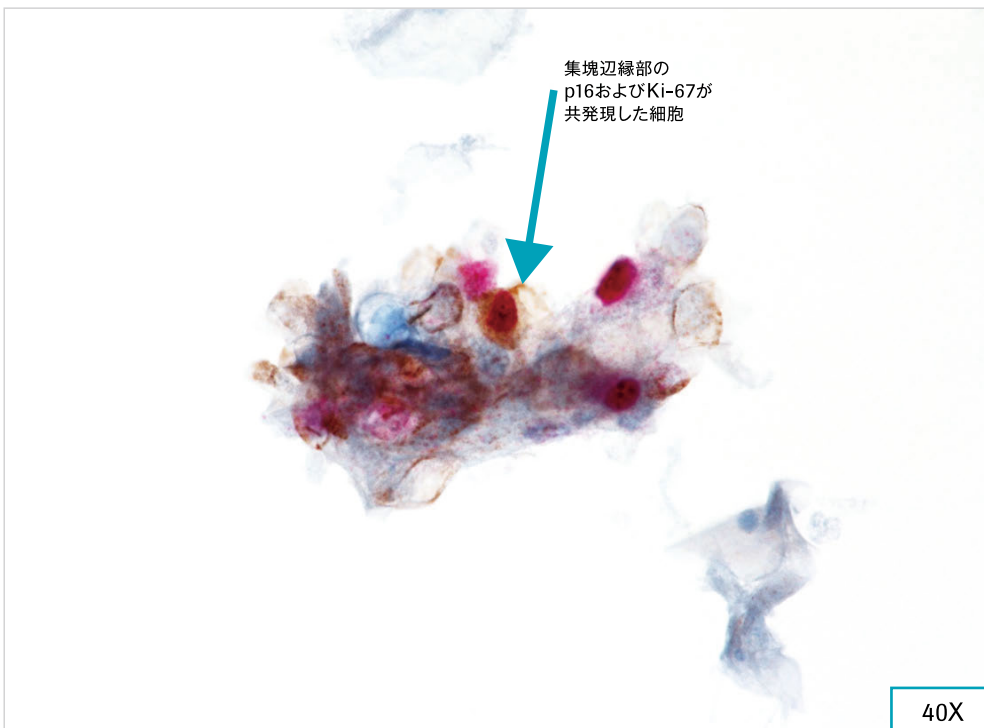
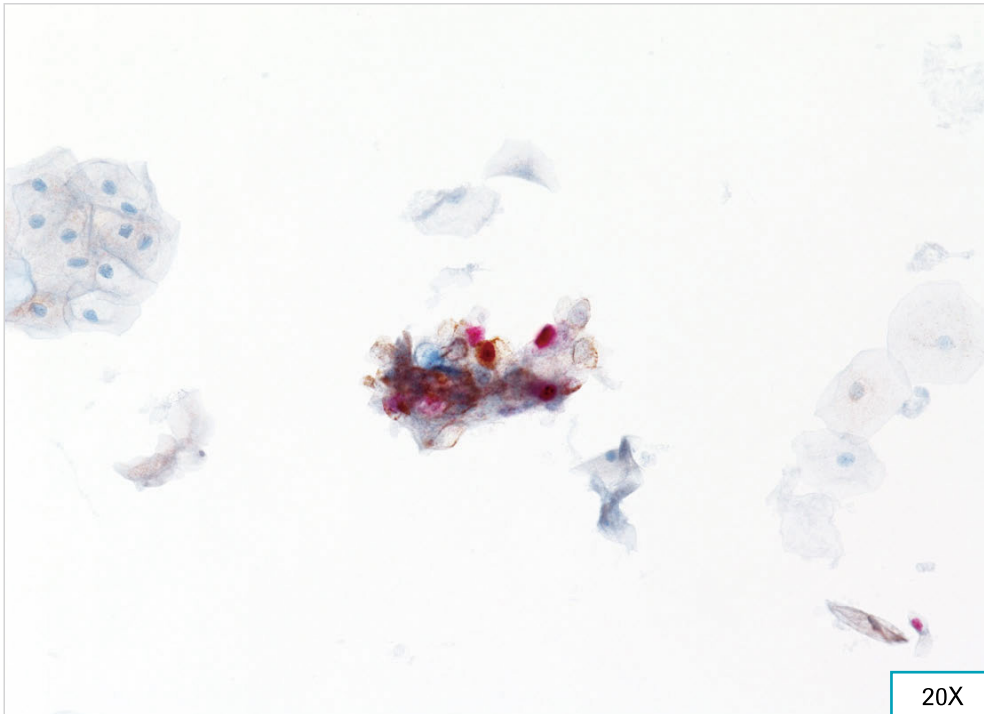


CINtec® PLUS Cytology陰性例:

限局性のp16の発現と核にKi-67の発現が認められるが、集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞は認められない。

図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67判定例



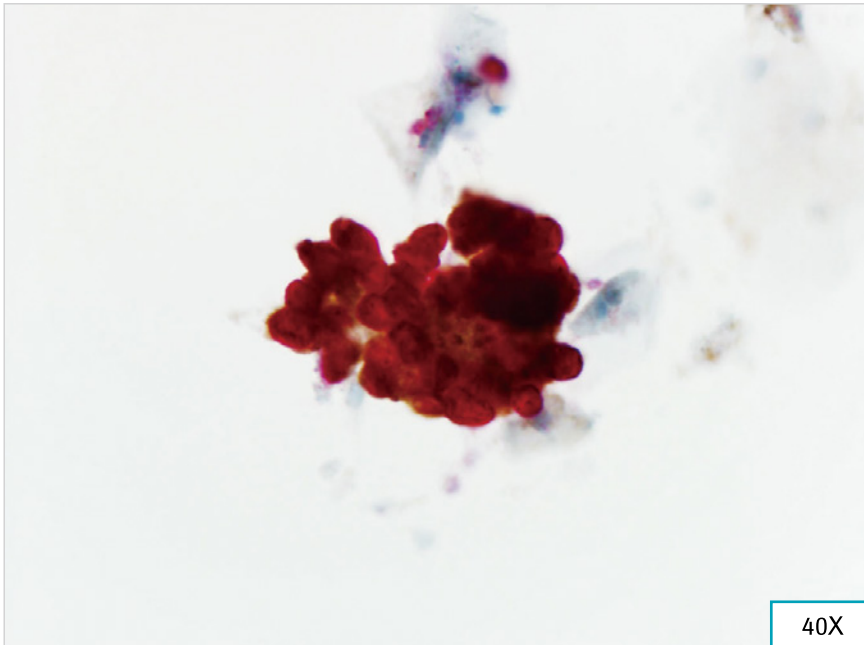
CINtec® PLUS Cytology陽性例:

集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が1個認められる。

また、この細胞集塊には、限局性のp16の発現と特異的な核のKi-67の発現も認められる。

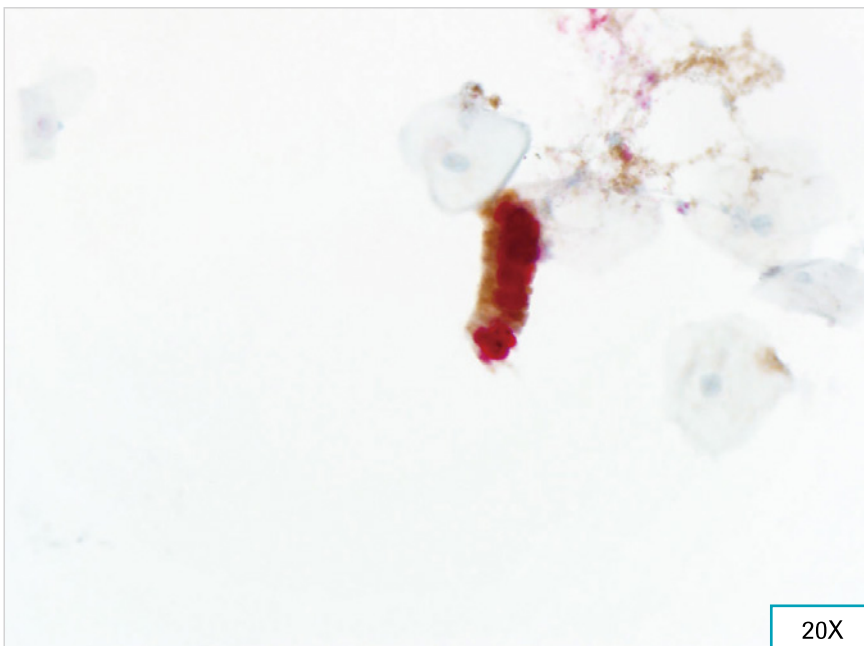
図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67判定例



CINtec® PLUS Cytology陽性例:

びまん性のp16の発現が認められ、内包されている核にKi-67の発現が認められる腺細胞集塊。
集塊辺縁部のp16およびKi-67が共発現した細胞は判定しにくい場合もある。

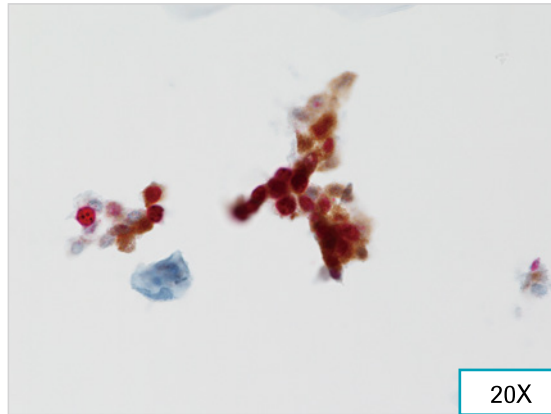
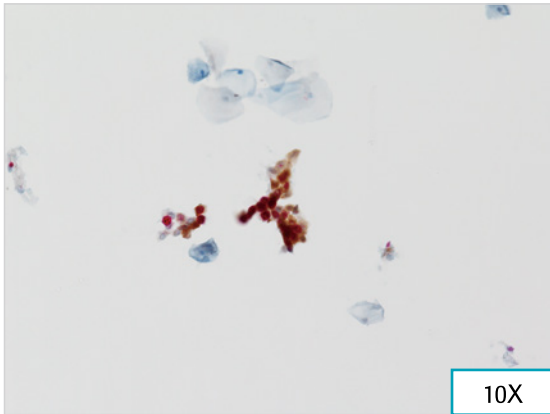


CINtec® PLUS Cytology陽性例:

集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる腺細胞集塊

図2.3(続き)

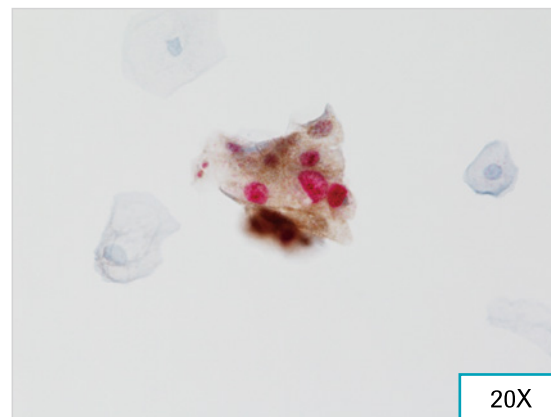
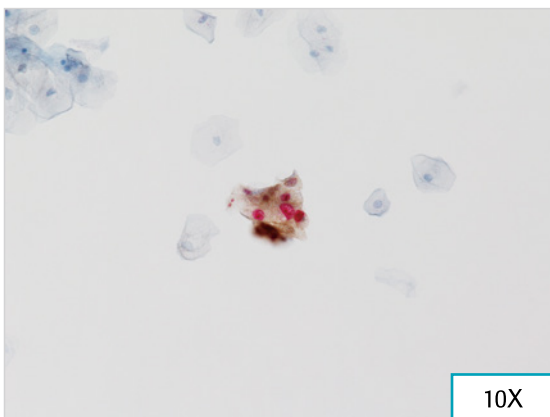
細胞集塊のp16およびKi-67判定例



CINtec® PLUS Cytology陽性例:

集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる細胞集塊。

この細胞集塊には、びまん性のp16の発現も認められる。



CINtec® PLUS Cytology陽性例:

集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる細胞集塊。

さらに、集塊全体にびまん性のp16の発現が認められる。この症例では、特異的なp16およびKi-67のさまざまな強度での発現が認められる。

図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67判定例



20X



40X

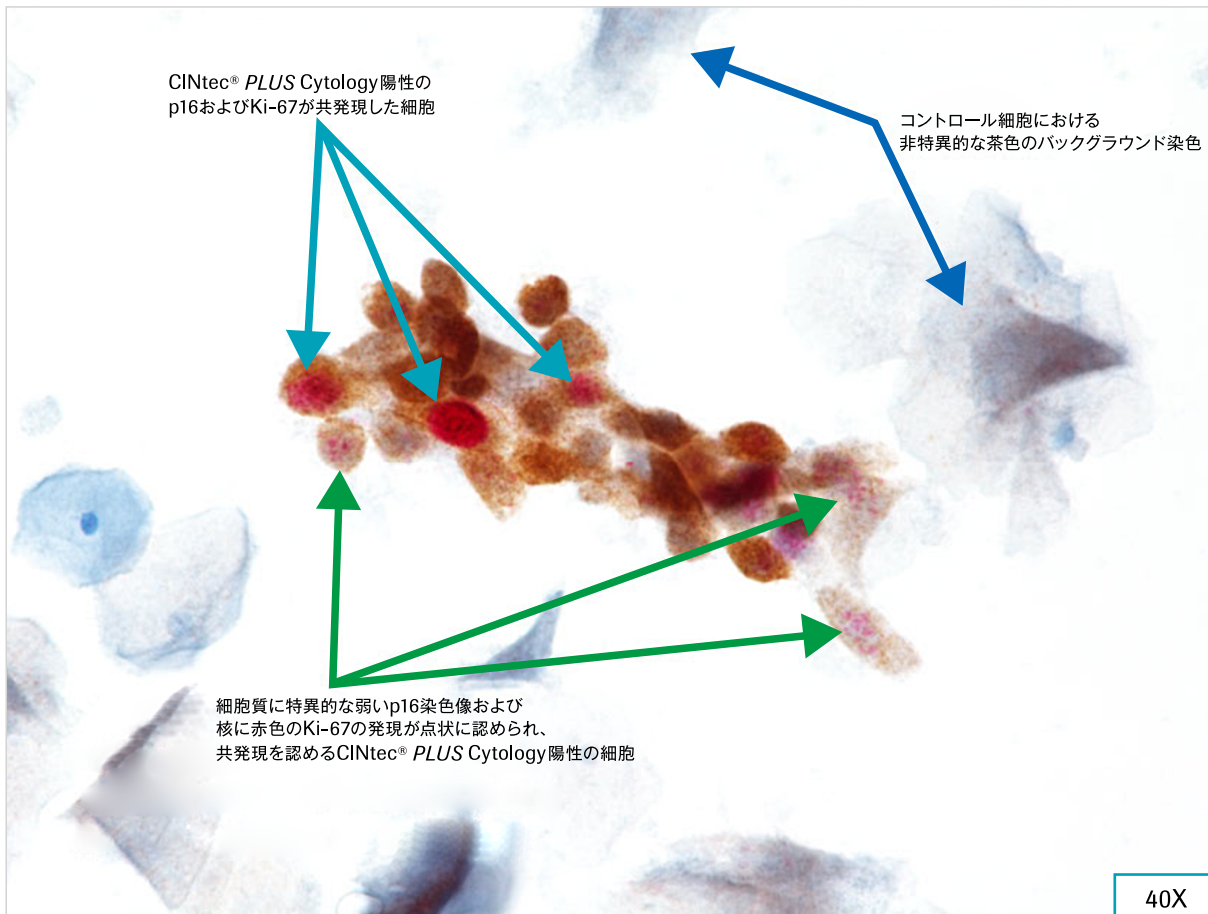
CINtec® PLUS Cytology陽性例:

辺縁部の個々のp16およびKi-67が共発現した細胞が見分けづらい細胞集塊もある。

びまん性のp16の発現が認められ、内包されている核に赤色のKi-67の発現が認められる。

図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67判定例



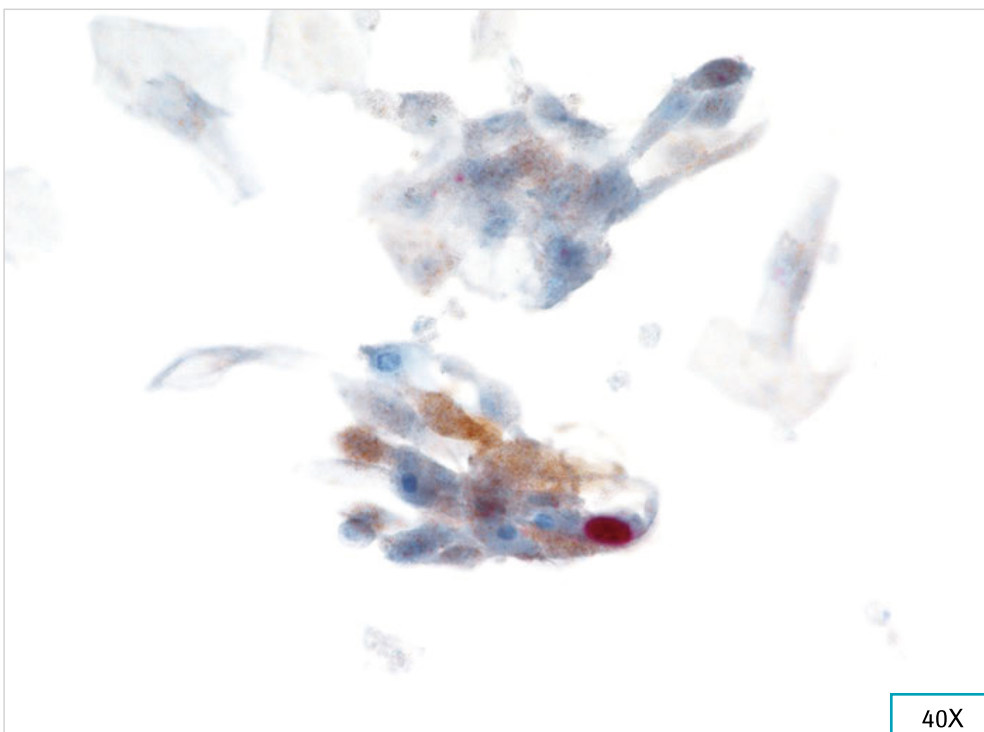
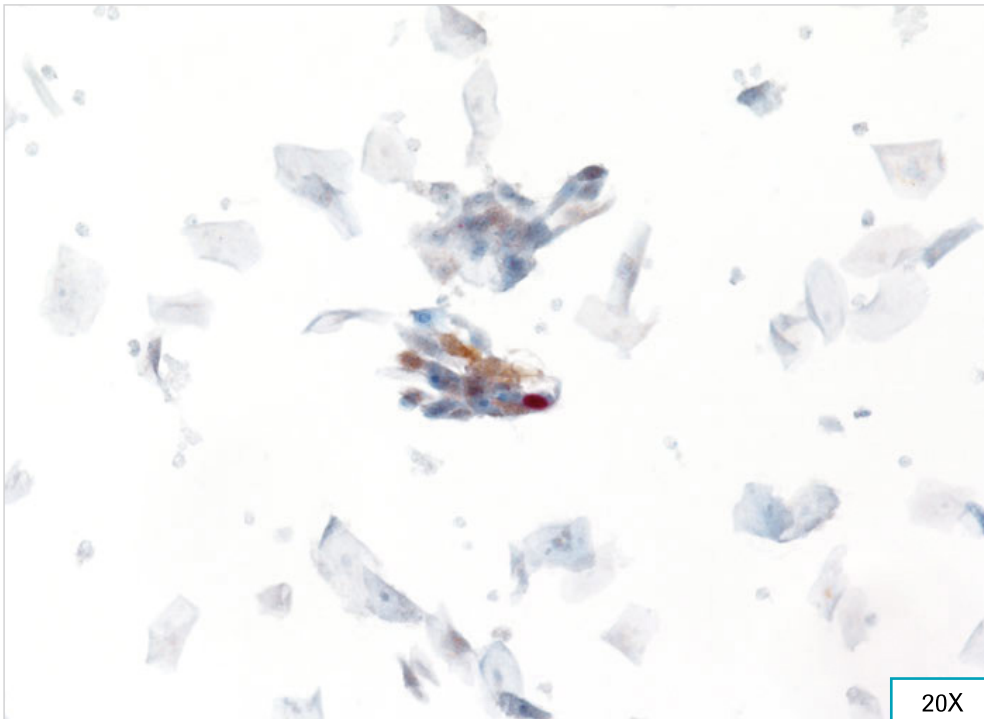
CINtec® PLUS Cytology陽性例:

特異的なp16およびKi-67の染色が認められ、集塊辺縁部にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる。

この細胞集塊には、特異的なびまん性のp16の発現も認められる。緑色の矢印で示した細胞には、細胞質に弱いp16の発現が認められ、核に特異的な赤色の点状のKi-67の発現を認める。緑色の矢印で示した細胞の細胞質に認められる、弱い特異的なp16の発現は、コントロール細胞における非特異的な茶色のバックグラウンド染色と比較して、濃い染色性を示し、色味が異なる。非特異的な赤色の点状のバックグラウンド染色は、コントロール細胞の細胞質や細胞外には認められない。非特異的なバックグラウンド染色やコントロール細胞については、次の項で解説する。

図2.3(続き)

細胞集塊のp16およびKi-67判定例



CINtec® PLUS Cytology陰性例:

限局性のp16の発現が認められるが、集塊辺縁部に共発現した細胞は認められない。

核にKi-67の発現が認められる細胞が1個あるが、細胞質にp16の発現は認められない。

標本の適正評価

パバニコロウ染色による細胞診のスクリーニングと同様に、CINtec® PLUS Cytologyは、ベセスダシステム2014子宮頸部細胞診報告様式 (The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, Solomon, 2014)に従って標本の適性を評価してください。²² ベセスダガイドラインでは、判定するために十分な細胞量(密度)は、パバニコロウ染色を行った液状化検体細胞診(LBC)スライド1枚につき、鏡検可能で良好に保存された扁平上皮細胞が5000個以上なければならないとしています。

ThinPrepおよびSurePathの標本に5000個以上の細胞を正確にカウントするには

- ThinPrep:無作為に選択した10視野(対物40倍)に、平均3~4個以上の扁平上皮細胞が認められる
- SurePath:無作為に選択した10視野(対物40倍)に、平均7~9個以上の扁平上皮細胞が認められる

「細胞量が不十分な不適正」検体は、二重染色陽性細胞が特定されなかった場合に限り、CINtec® PLUS Cytologyの判定対象から除外してください。判定に十分量の良好に保存された扁平上皮細胞が5000個未満のスライドに、少なくとも1個のp16およびKi-67の共発現した細胞が認められた場合は、細胞量が不十分であっても判定を行い、CINtec® PLUS Cytology陽性として報告します。

陽性コントロールと陰性コントロール

陽性コントロール

標本作成および染色の全工程を確認するため、既知の陽性コントロールをたてることを推奨します。既知の陽性コントロールスライドは、標本作成と試薬の精度管理の目的でのみ使用し、患者検体を判定する際のコントロールとしては使用しないようにしてください。患者検体と同じ方法で処理した標本を陽性コントロールとして使用してください。陽性コントロールは、標本が正しく作製され、適切に染色がなされたかを確認するものです。各染色につき必ず1つ陽性コントロールをたてる必要があります。

陽性コントロールスライドで適切な陽性を確認できなかった場合、患者標本の判定は無効とみなします。

陰性コントロール

子宮頸部細胞診の標本には通常、p16INK4aとKi-67の発現が陰性であることが既知の細胞(表層細胞など)が多数存在するため、バックグラウンドを評価するための内部陰性コントロールとして用いることができます。子宮頸部細胞診の標本中の中層および表層扁平上皮細胞は、細胞の分化を経て細胞周期が停止した最終分化細胞であり、p16およびKi-67蛋白の発現が陰性であるため、内部陰性コントロールとして使用することができます。「コントロール細胞」については、セクション5で取り上げます。



非特異的なバックグラウンド染色とアーチファクト

CINtec® PLUS Cytologyを用いて染色した標本の大半は、容易に陽性または陰性と判定できますが、一部の症例では判定や解釈に悩む症例があります。

本項では、以下のような非特異的なバックグラウンド染色やその他のアーチファクトが認められるCINtec® PLUS Cytologyの判定方法について説明します。

- 非特異的な茶色のバックグラウンド染色
- 非特異的な赤色のバックグラウンド染色とアーチファクト
- 細胞外成分の非特異的な染色
 - 細胞外成分による上皮細胞の不明瞭化を含む
- 標本作製時のアーチファクト

非特異的なバックグラウンド染色

DAB(茶色)やファーストレッドの発色基質は、非特異的なバックグラウンド染色が生じることがあり、判定が難しくなることがあります。DABやファーストレッドの発色基質は、さまざまな強度、分布および特性を示します。細胞内に閉じ込められたり、細胞の上下に重なって見えたりとさまざまです。

- 強度: 弱 / 中 / 強
- 分布: 少数の細胞 ~ 全細胞
- 特性: 均一または不均一

非特異的な茶色のバックグラウンド染色

核にKi-67の発現が認められ、細胞質に非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められる増殖能を有する細胞があった場合、細胞質の非特異的な茶色のバックグラウンド染色を共発現とみなしている可能性を考慮しないと、偽陽性の原因となります。

細胞質の特異的なp16の発現と非特異的な茶色のバックグラウンド染色を区別するために、正常表層扁平上皮細胞を「基準」にして評価します。正常表層扁平上皮細胞は、成熟した最終分化した細胞であるため、p16やKi-67を発現しません。基準となる細胞は、個別の細胞やシート状集塊で出現します。スライド中の中～多数のコントロールとなる細胞に茶色の染色が認められる場合、それを非特異的な茶色のバックグラウンド染色とみなします。p16およびKi-67が共発現した細胞と判定する、特異的なp16の染色性は周囲のコントロールとなる細胞に認められる非特異的な染色性よりも染まりが濃いはずで、重積性のある集塊状のコントロール細胞のバックグラウンド染色は、評価から除外してください。細胞が重積していると、非特異的なバックグラウンド染色が実際より濃く見えます。コントロールとする細胞は、単一のシート状集塊または孤立した細胞としてください。

重要ポイント

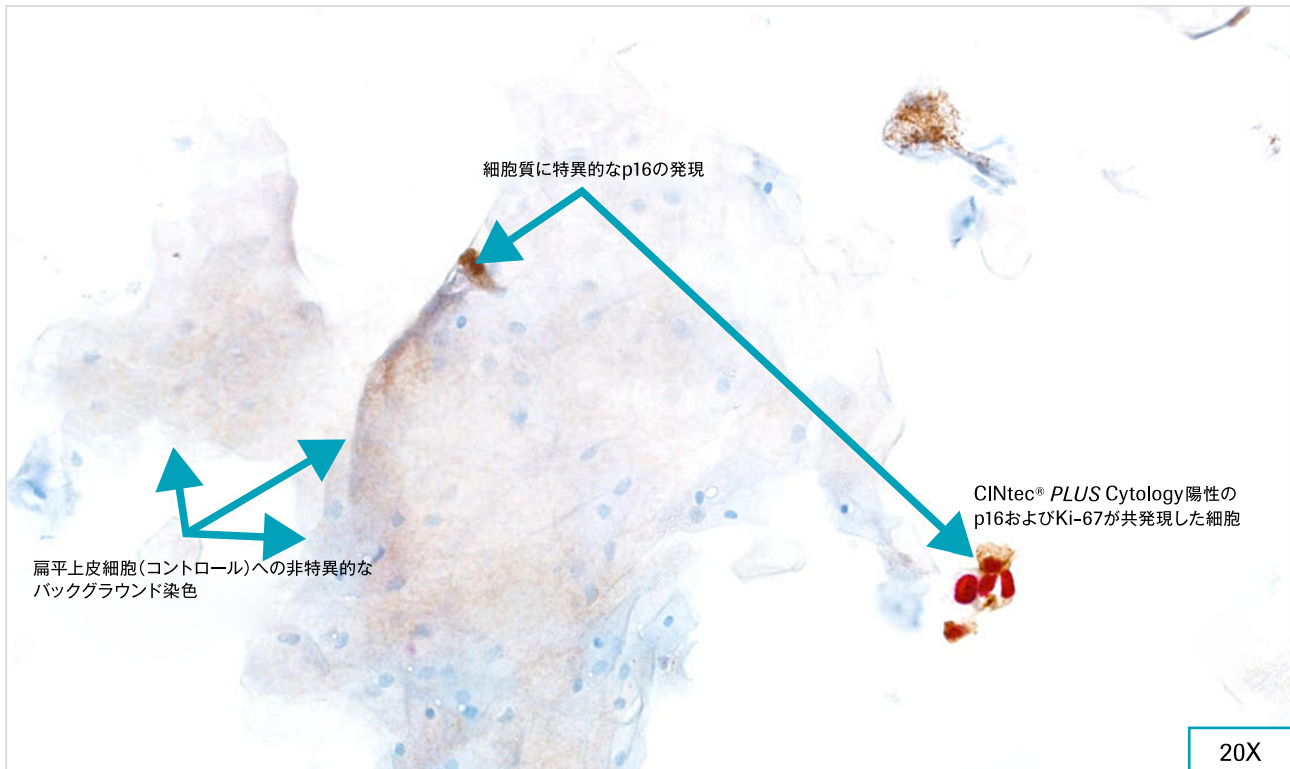
コントロールとなる細胞に非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められる場合、判定が偽陽性となるのを避けるため、以下のガイドンスに従うことを推奨します。

- 単一または複数のp16およびKi-67が共発現した細胞(CINtec® *PLUS* Cytology陽性)を判定するには、共発現したとする細胞の細胞質に認められる茶色のp16の染色性は、対物20～40倍において同一視野内にある周囲のコントロール細胞の細胞質に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色よりも染色性が強くなければならない。図3.0～3.3を参照。



図3.0

非特異的な茶色いバックグラウンド染色



コントロール細胞に非特異的なバックグラウンド染色が認められる場合、上記の症例を参考にしながら、以下を考慮して二重染色の細胞を判定してください。

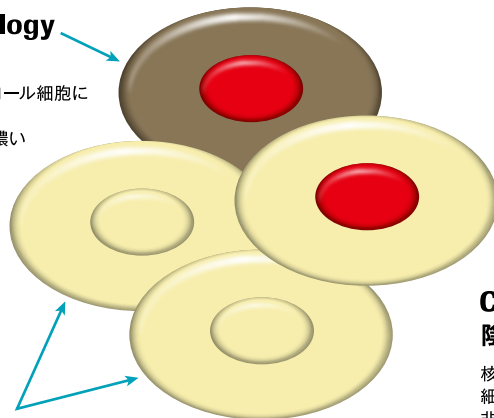
- シート状の扁平上皮細胞(コントロール細胞)に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色と、標的とする細胞(細胞質に茶色の染色が認められ、核に特異的な赤色のKi-67染色が認められる細胞)とを比較する
- 標的とする細胞に認められる茶色の細胞質の染色性を特異的なp16染色性であると判定するためには、コントロール細胞に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色よりも染色強度が強くなければならない
- 標的とする細胞に特異的なp16染色が認められ、かつその核に特異的なKi-67染色が認められることが確認された場合、その細胞は共発現したCINtec® PLUS Cytology陽性の細胞と判定される

図3.1

CINtec® PLUS Cytologyで認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色の説明

CINtec® PLUS Cytology
陽性細胞

茶色のp16染色は、周囲のコントロール細胞に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色よりも強く濃い染色性を示す



非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められるコントロール細胞

CINtec® PLUS Cytology
陰性細胞

核に特異的なKi-67発現が認められたとしても、細胞質の茶色い染色性がコントロール細胞に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色と同程度である

非特異的な茶色のバックグラウンド染色の評価

1. コントロール細胞(正常な扁平上皮細胞)と標的とする細胞(細胞質に茶色の染色が認められ、核に特異的な赤色のKi-67染色が認められる細胞)を比較する。
2. 標的とする細胞に認められる茶色の細胞質の染色性は、コントロール細胞に認められる茶色染色より濃いか？
 - a. No: 標的とする細胞の細胞質に認められる茶色の染色が非特異的な茶色の染色である場合 → CINtec® PLUS Cytology陰性
 - b. Yes: 標的とする細胞の細胞質に認められる茶色の染色が特異的なp16の発現である場合 → CINtec® PLUS Cytology陽性

図3.2

p16とKi-67が共発現した細胞に認められる特異的な茶色のp16の発現は、
コントロール細胞の細胞質に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色よりも濃い染色性を示す

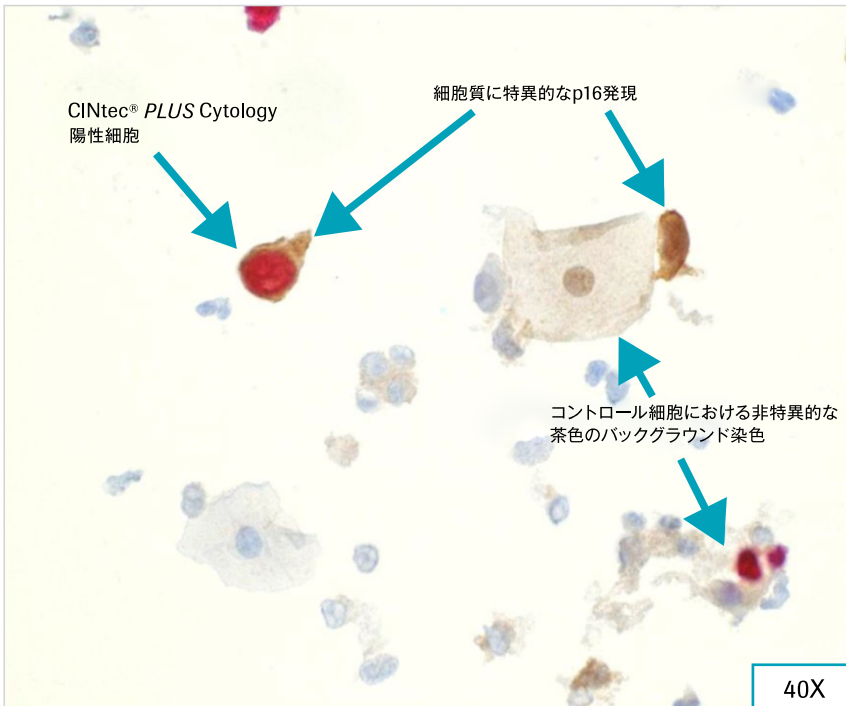
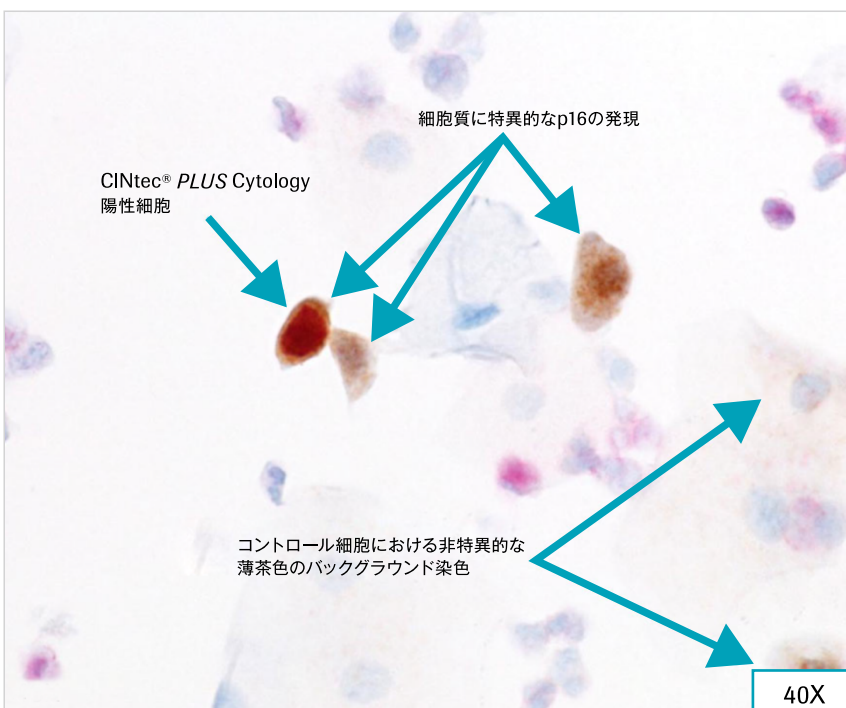


図3.3

p16およびKi-67が共発現した細胞に認められる特異的な茶色のp16の発現は、
コントロール細胞に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色よりも濃い染色性を示す



非特異的な赤色のバックグラウンド染色

非特異的な赤色のバックグラウンドは、一般的に「点状」に出現することが多く、子宮頸部細胞の細胞質や核の上下または内部に認められることがあります。また、コントロール細胞の細胞質や核に認められることもあれば、CINtec® PLUS Cytology陽性のp16およびKi-67が共発現した陽性細胞の細胞質に認められることもあります。非特異的な赤色の点状のバックグラウンド染色は、スライドの細胞外にも認められることがあります。

前述の通り、特異的なKi-67の核への発現には、核内に均一な染色性や、顆粒状または点状の染色パターンを示す部分的な染色性があります。赤い点状の染色は、特異的なKi-67の核への発現である可能性があるため、点状に認められる非特異的な赤色のバックグラウンド染色と区別する必要があります。

特異的および非特異的なKi-67の核染色性を判別するための基準

- 点状の非特異的な赤色のバックグラウンド: 核内に点状の赤色染色が認められ、細胞質、細胞外、または他のコントロール細胞にも同様な赤色の点状シグナルが認められる場合、これは非特異的な赤色のバックグラウンド染色であり、この核には特異的なKi-67の発現は認められないものと判定します。(図3.4参照)
- 赤色の点状の核に特異的なKi-67の染色性: 核に赤色の点状または顆粒状のシグナルが認められ、その細胞の細胞質、他のコントロール細胞の細胞質または細胞周辺に赤い点状の染色性が認められない場合に限り、特異的と判定します。その細胞に特異的なp16の発現も認められる場合は、赤色の点状のシグナルが核に局限されていれば、共発現した細胞として判定することができます。(図3.5参照)

核に均一な赤色のKi-67の発現を示す細胞が認められる際、コントロール細胞やその他の場所に認められる点状の赤色の染色は、非特異的な赤色のバックグラウンド染色として度外視します。(図3.6参照)

特定されたp16およびKi-67が共発現した細胞が1~3個しか認められない場合は、判定が陽性であることを確認するため、均一なKi-67の発現と特異的なp16の発現が認められる細胞を見つけることを推奨します。同様に、細胞質に特異的なp16の発現が認められ、核に特異的な点状または部分的なKi-67の発現が認められる共発現した細胞が1~3個特定されたが、いずれの細胞にも均一なKi-67の発現が認められない場合は、核に点状または部分的なKi-67の発現が認められる共発現した細胞をもって陽性と判定します。

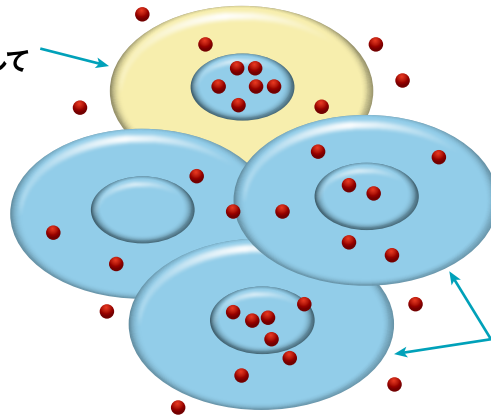
その他の赤いスペキュリング例は、図3.7~3.10を参照。

注意点: 特異的なKi-67の発現であると評価するためには、顕微鏡の微動ハンドルを使用して、赤い点状のシグナルが核と同一焦点上にあることを確認してください。

図3.4

CINtec® PLUS Cytology
陰性細胞 (共発現した細胞として判定しない)

特異的な(弱い)p16の発現が認められるが、赤いスペキュリングがすべての細胞の細胞質/核と細胞外にも認められることから特異的なKi-67の発現とはみなせない

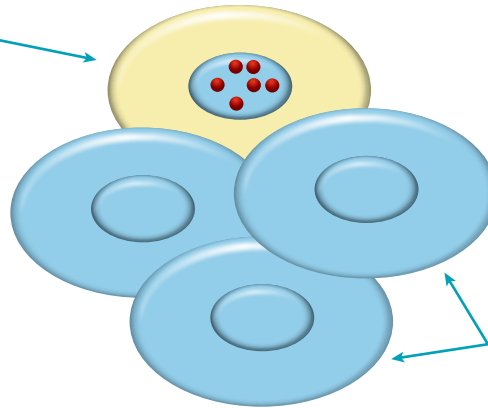


コントロール細胞の核や細胞質、または細胞外に赤いスペキュリングが認められるが、非特異的な茶色のバックグラウンド染色は認められない

図3.5

CINtec® PLUS Cytology
陽性細胞

赤い点状のシグナルはこの細胞の核のみに限局されている特異的なKi-67の発現である。茶色のp16の発現は弱いが確認でき、コントロール細胞に非特異的な茶色のバックグラウンド染色は認められない

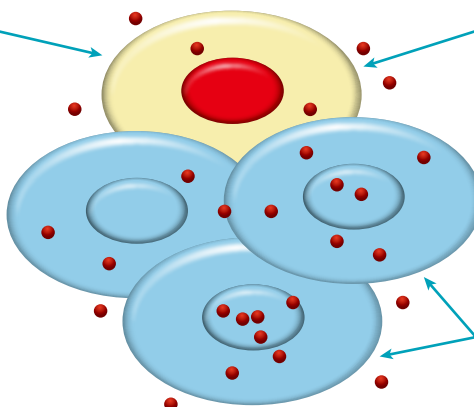


コントロール細胞の核や細胞質、または細胞外に赤いスペキュリングは認められず、非特異的な茶色のバックグラウンド染色も認められない

図3.6

CINtec® PLUS Cytology
陽性細胞

赤色の核染色パターンは均一で特異的なKi-67の発現である。この細胞の赤いスペキュリングは非特異的なバックグラウンド染色として無視することができ、この共発現した細胞の判定には問題とならない



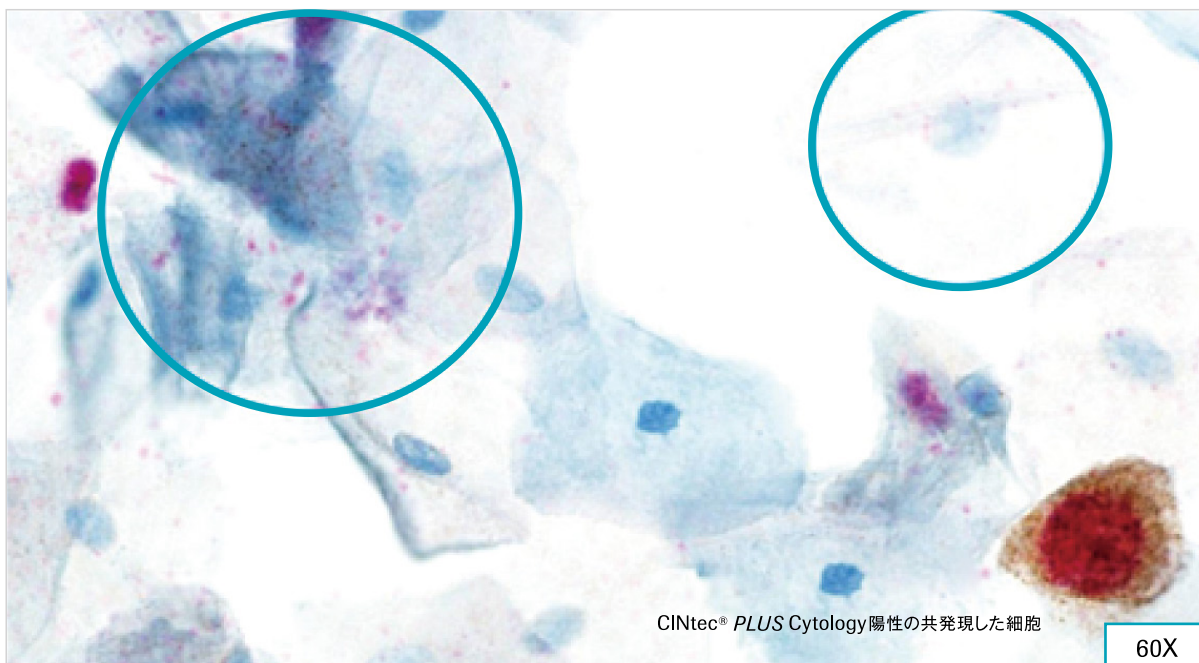
茶色のp16の発現は弱いが確認でき、コントロール細胞に非特異的な茶色のバックグラウンド染色は認められない

コントロール細胞の核や細胞質、または細胞外に赤いスペキュリングが認められるが、非特異的な茶色のバックグラウンド染色は認められない

図3.7

CINtec® PLUS Cytology陽性例に、認められる赤い点状の非特異的なバックグラウンド染色

赤い点状に認められる非特異的なバックグラウンド染色は、一般的に判定の妨げとはならない。



CINtec® PLUS Cytology陽性の共発現した細胞

60X

**図3.8**

CINtec® PLUS Cytology陰性の細胞集塊に認められる、細胞質内または細胞質上の細胞外粒子に染まる非特異的な赤色のバックグラウンド染色

注意点:核の上または核内に点状の赤色シグナルが認められても、この細胞集塊はやはり陰性。

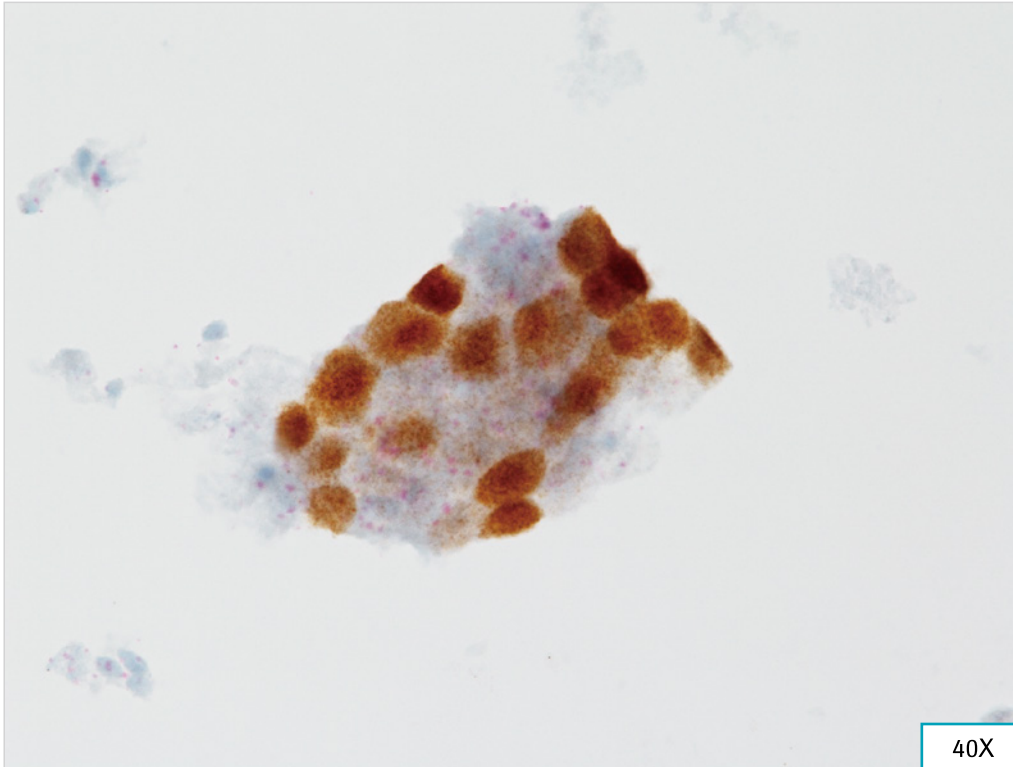


図3.9

粘液または血液による赤いスペキュリング(非特異的バックグラウンド)

このアーチファクトは、子宮頸部細胞の外に認められ、一般的にCINtec® PLUS Cytologyの判定には影響しない。p16およびKi-67が共発現した細胞(丸で囲んだ部分)が認められ、CINtec® PLUS Cytology陽性となる。

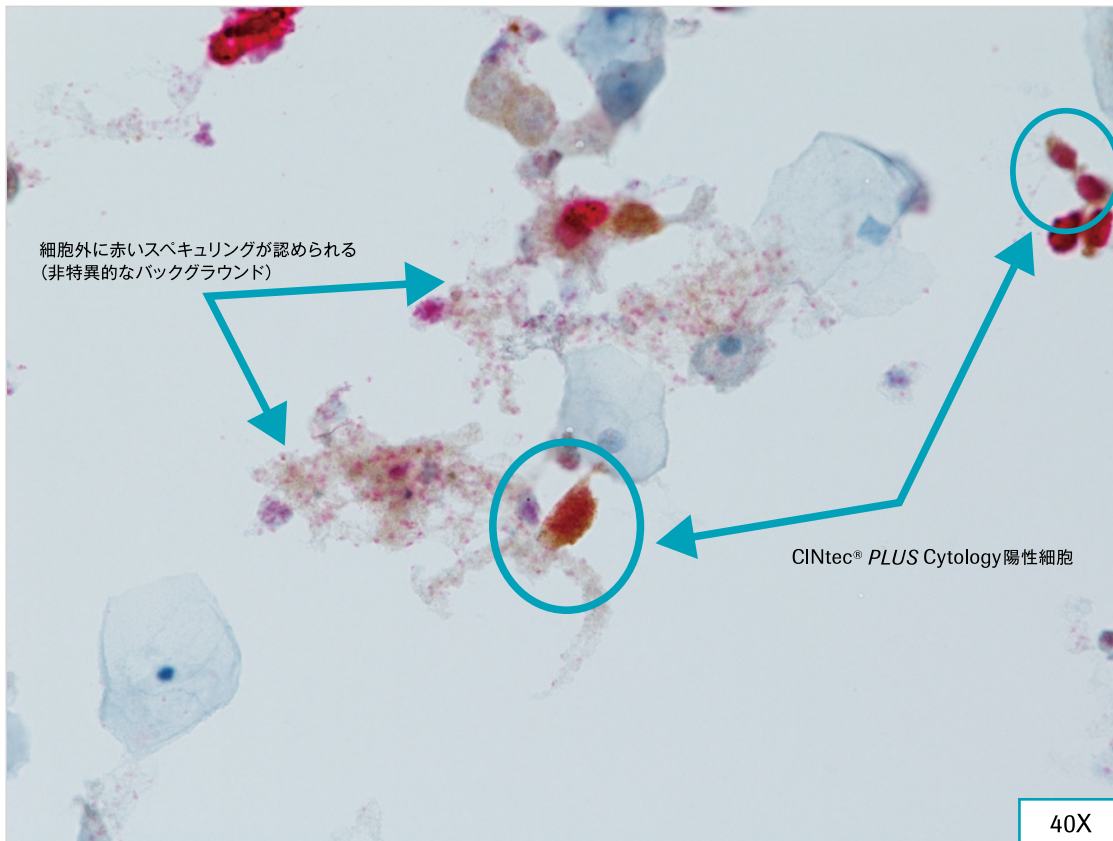


図3.10

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質にp16の発現が認められ、核に弱いKi-67の発現が認められる

共発現した細胞の細胞質に非特異的な赤いスペキュリングが認められるが、特異的なp16およびKi-67の発現の判定には影響しない。



茶色および赤色の非特異的なバックグラウンド染色の例

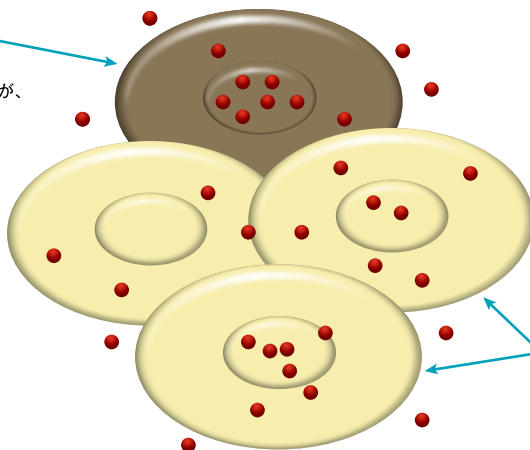
図3.11

CINtec® PLUS Cytology陰性例:

特異的なp16染色細胞と茶色および赤色の非特異反応が認められる

共発現した細胞として 判定しない

細胞に特異的なp16の発現が認められるが、赤いスペキュリングがコントロール細胞の細胞質／核や細胞外にも認められることから特異的なKi-67の発現とはみなせない



コントロール細胞の核、細胞質および細胞外に赤いスペキュリングが認められ、非特異的な茶色のバックグラウンド染色も認められる

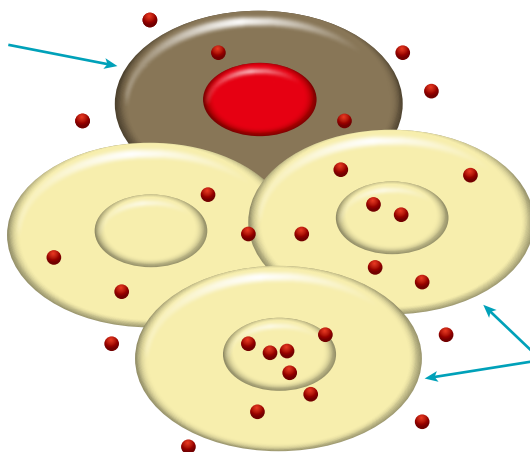
図3.12

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

p16およびKi-67が共発現した細胞に、茶色および赤色の非特異反応が認められる

CINtec® PLUS Cytology 陽性細胞

核に赤く均一な特異的なKi-67の発現を認める。この細胞の赤いスペキュリングは非特異的なバックグラウンド染色として無視することができ、この共発現した細胞の判定には影響しない



コントロール細胞の核、細胞質および細胞外に赤いスペキュリングや、非特異的な茶色のバックグラウンド染色も認められる

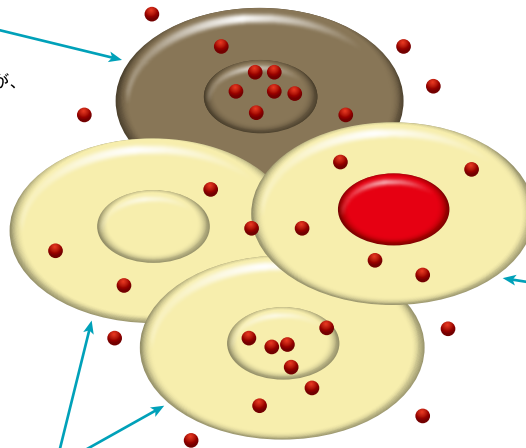
図3.13

CINtec® PLUS Cytology陰性例:

特異的なp16の発現とKi-67の発現が異なる細胞に認められ、茶色および赤色の非特異反応が認められる

**共発現した細胞として
判定しない**

細胞に特異的なp16の発現が認められるが、赤いスペキュリングがすべての細胞の細胞質/核と細胞外にも認められることから特異的なKi-67の発現とはみなせない



**共発現した細胞として
判定しない**

核に均一に特異的なKi-67の発現が認められているが、細胞質の茶色い染色性はコントロール細胞に認められる非特異的な茶色のバックグラウンド染色と同程度である

非特異的な茶色および赤いスペキュリングが認められるコントロール細胞

非特異的なバックグラウンド染色の評価

CINtec® PLUS Cytologyは、必ず以下の表の基準に従って非特異的なバックグラウンドを鑑みて判定する必要があります。細胞質の染色(p16)や核の染色(p16またはKi-67)が正常細胞や異常細胞に特異的に認められるのに対し、非特異的なバックグラウンドは正常な個々の扁平上皮細胞やコントロール細胞に認められる可能性があります。

バックグラウンド染色が認められた際の適性の定義

適	非特異(バックグラウンド)反応が認められない
	非特異反応がわずかに認められるが、特異的な染色性の判定の妨げとはならない
	非特異反応がある程度認められるが、特異的な染色性の判定の妨げとはならない
	非特異反応がかなり認められるが、特異的な染色性の判定の妨げとはならない
不適	非特異反応がかなり認められ、特異的な染色性の判定の妨げとなる

バックグラウンド染色が不適であった症例は、不適または判定不能と報告してください。



赤発色基質のブリーディング(滲み)

赤発色基質の滲みは非特異的アーチファクトであり、核に強い特異的なKi-67発現が認められる場合に、ファーストレッドが細胞質に滲み出すことによって生じることがあります。

図3.14

細胞質への赤発色基質の滲みが認められる細胞集塊

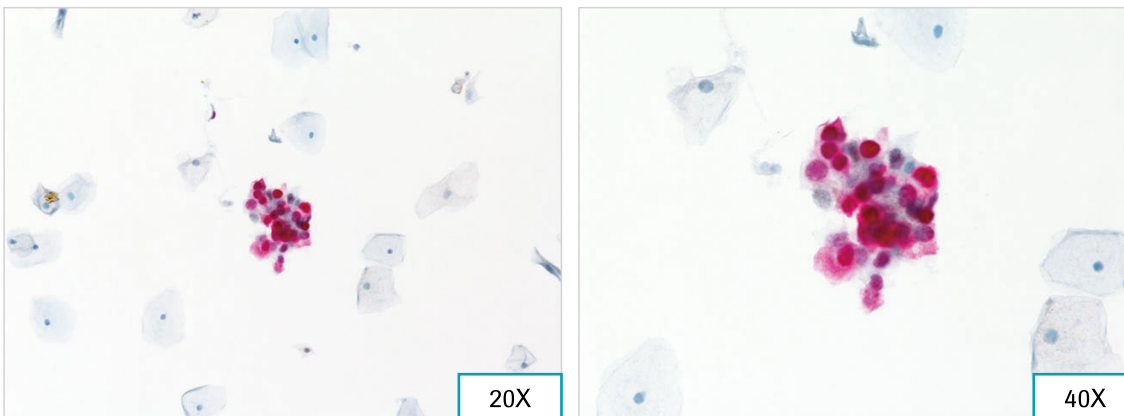
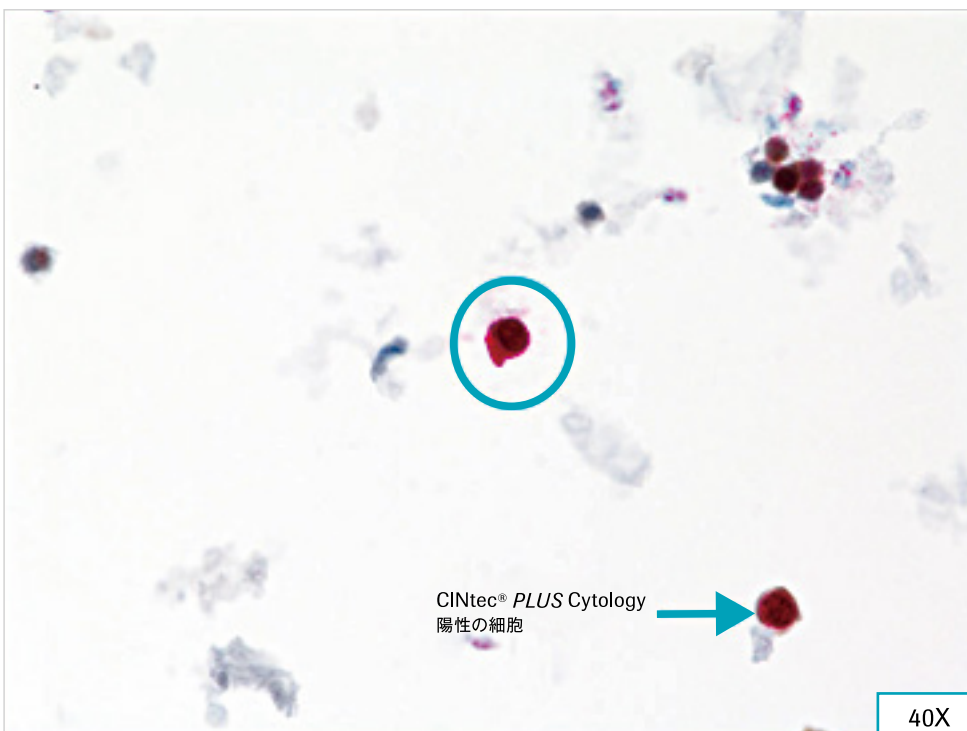


図3.15

細胞質への赤発色基質の滲みが認められる孤立細胞

共発現した細胞(右下)は、核を取り囲むように薄くp16が特異的に細胞質に認められ、CINtec® PLUS Cytology陽性と判定される。



細胞外成分への非特異反応

細胞外成分は、DAB(茶色)およびファーストレッド発色基質の成分に染まる場合があります。

以下の細胞外成分が非特異反応を引き起こします。

- 細菌
- 血液
- 粘液
- 炎症
- 酵母やカンジダ

細胞外成分の非特異反応による不明瞭化

細菌、血液、粘液および炎症による非特異反応により、鏡検領域内における上皮細胞の75%以上が不明瞭な場合、このような症例は、Ki-67およびp16が共に発現した細胞が認められないとは判定できないとし、判定せずに「細胞外成分により不明瞭のため不適正」として報告してください。

細胞外成分の非特異反応によりスライドの75%以上が不明瞭だが、p16およびKi-67が共に発現した細胞が少なくとも1個認められる場合は、CINtec® PLUS Cytology 陽性として報告してください。

細菌、血液、粘液および炎症による非特異反応は、コントロール細胞への非特異的な染まりとは別物であり、茶色の特異的な染色性を判定する際の比較対象とすることはできません。同一症例に、細菌、血液、粘液または炎症による非特異反応と、コントロール細胞への非特異的な染まりの両方が認められる場合は、p16およびKi-67が共発現した細胞かを判定する際に、まず初めに細菌、血液、粘液または炎症による非特異反応か、コントロール細胞への非特異的な染まりかを区別しなければなりません。CINtec® PLUS Cytologyの標本に認められる可能性がある細胞外成分の非特異反応の例については、図3.16~3.22をご参照ください。

図3.16

CINtec® PLUS Cytology 陰性例:

変性した核にKi-67の発現が認められ、粘液や血液への赤色および茶色の非特異反応が認められる。

粘液や血液の非特異反応を特異的な細胞質への染まりと判定しないようにすること。

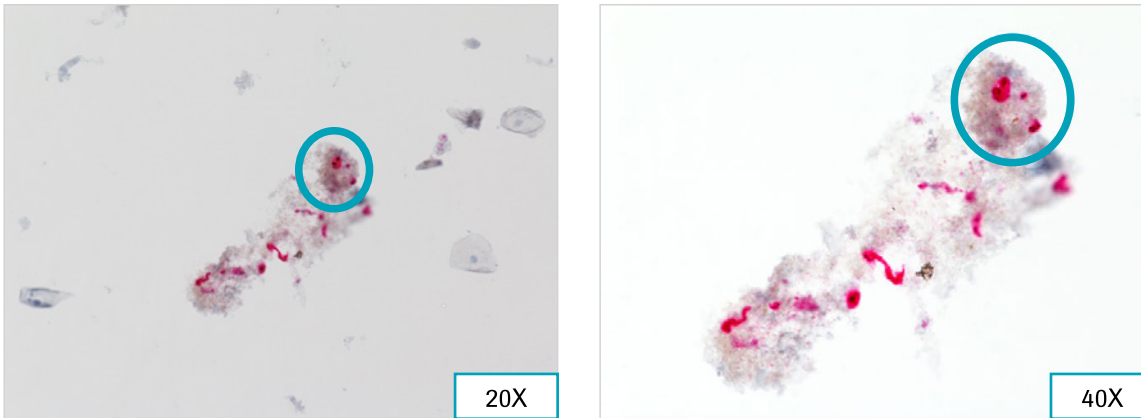


図3.17

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

Ki-67およびp16が共発現した細胞(丸で囲んだ部分)と、粘液または血液に赤く点状に非特異反応が認められる

このアーチファクトは、子宮頸部細胞外に認められるものであり、一般的にCINtec® PLUS Cytologyの判定の妨げとはならない。

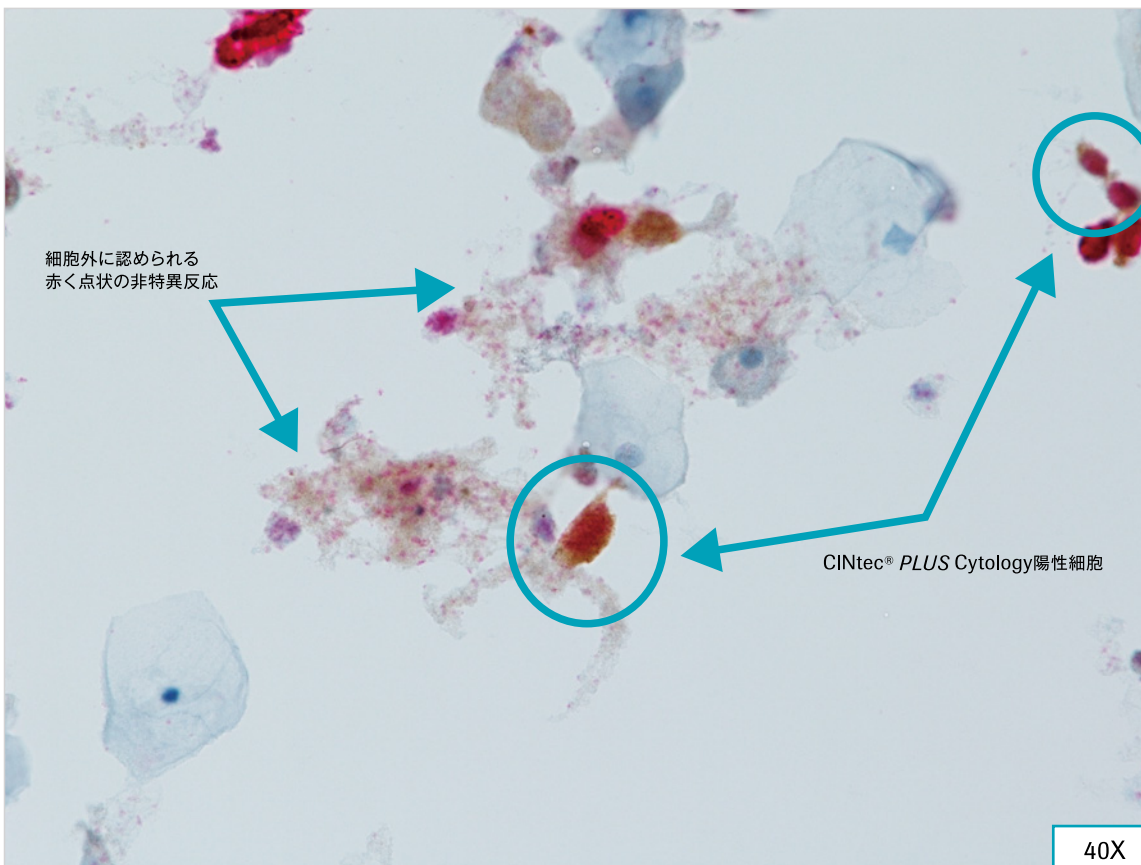


図3.18

粘液への茶色い非特異反応

粘液への非特異反応は、発色基質であるDAB(茶色)またはファーストレッドにより生じる可能性がある。

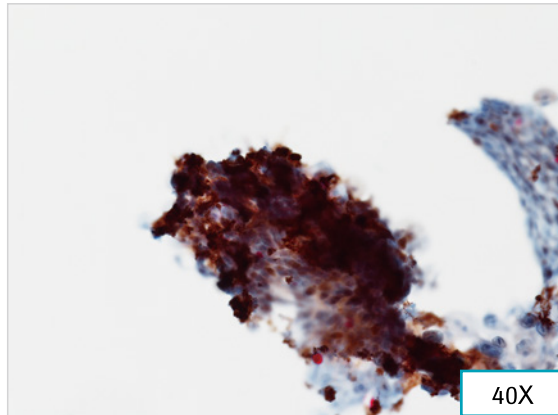
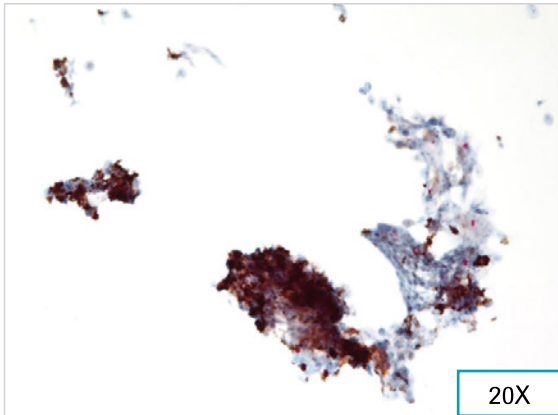


図3.19

好中球への非特異反応(赤色のアーチファクト)

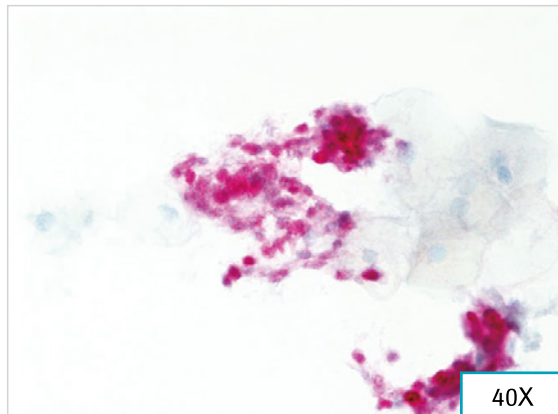
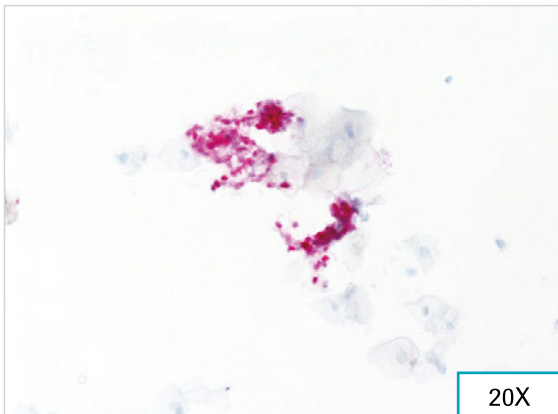


図3.20

細菌への非特異反応(赤色のアーチファクト)
細菌は非特異反応より茶色に染まることもある。

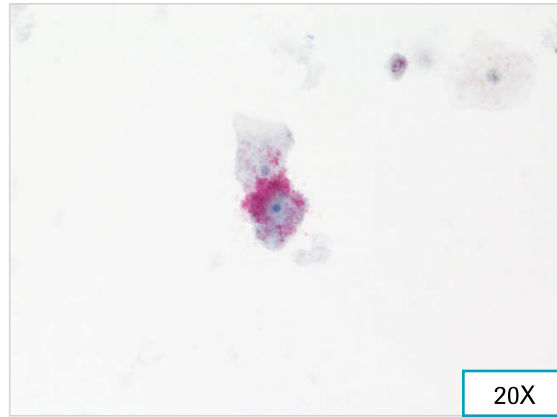
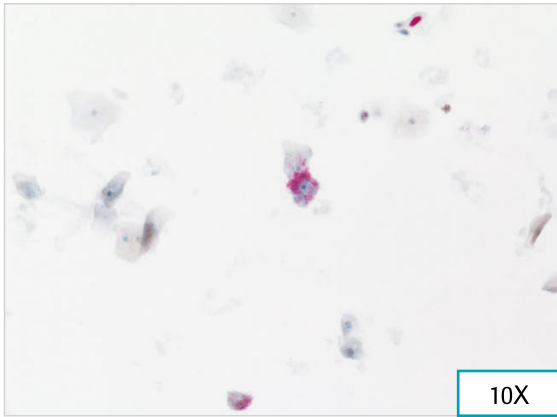


図3.21

カンジダの染色

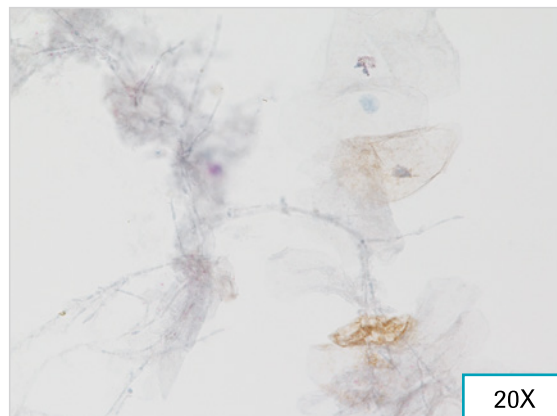
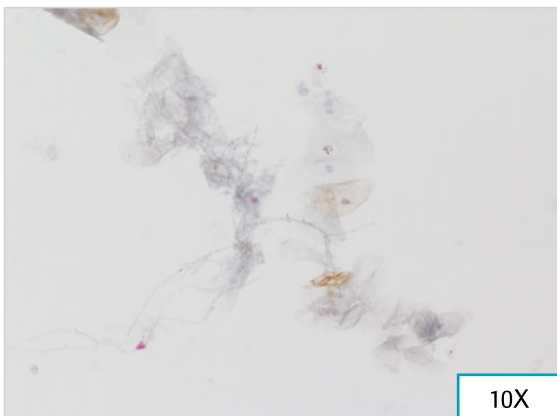
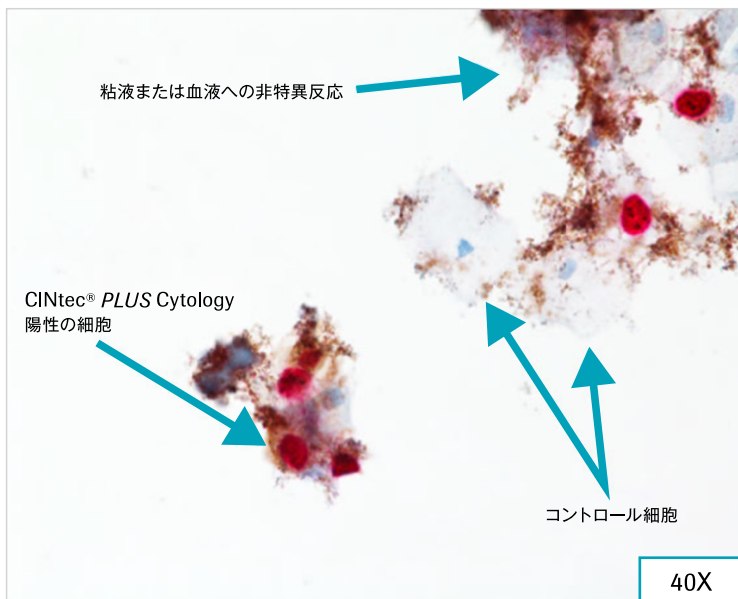
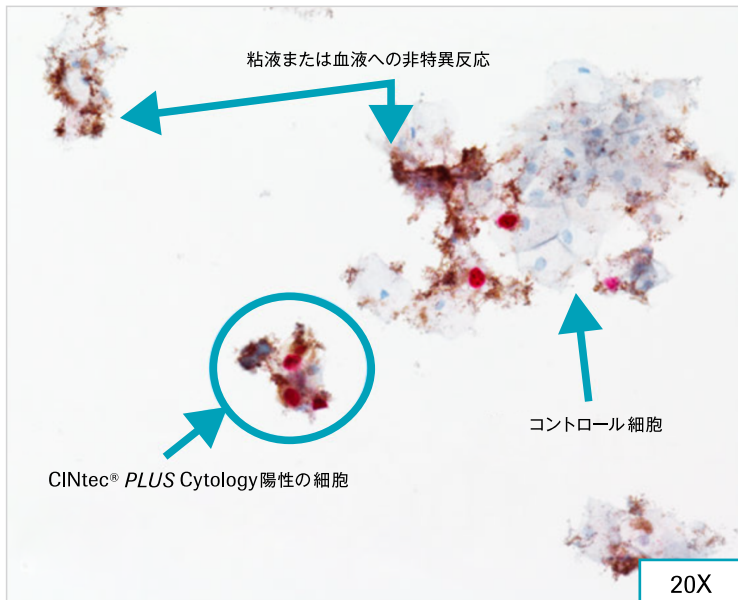


図3.22

CINtec® PLUS Cytology陽性例:

Ki-67およびp16が共発現した細胞が認められる。粘液または血液への茶色い非特異反応が認められる



茶色く染色された粘液または血液の中にp16およびKi-67が共発現した細胞が認められる。この細胞のp16の染色性は、コントロール細胞に認められる非特異的な茶色いバックグラウンド染色よりも濃い染色性である。粘液または血液への非特異的な茶色のアーチファクトはバックグラウンド染色とはみなされず、扁平上皮細胞の特異的な染色性を判定する際の基準にすることはできない。非特異的なバックグラウンド染色の詳細については、「判定困難な例」のセクションを参照のこと。



非特異反応によるバックグラウンド染色と細胞外成分への非特異的染色の違い

非特異反応によるバックグラウンド染色	非特異的なアーチファクト
コントロール細胞の細胞質または核に認められる茶色の染色	血液および粘液への茶色または赤色の染まり
コントロール細胞やKi-67およびp16が共発現した細胞の核および細胞質、または細胞外にも認められる一般的に点状に出現する赤色の染色	炎症細胞への赤色の染まり
核に特異的な赤色の染色が細胞質までしみ出た状態	細菌への赤色および茶色の染まり

標本作製時におけるアーチファクト

CINtec® PLUS Cytologyの標本作製における技術的なアーチファクト

- 染色後の工程において、水溶性封入剤を十分に乾燥させなかったために生じる封入剤のひび割れ。図3.23を参照。
- 染色後の工程において、自然乾燥させたために生じる「コーンフレーク状」のアーチファクト。図3.24を参照。
- 茶色のバックグラウンド染色を伴ったコントロールである扁平上皮細胞への不均一な対比染色は、水道水の水質に起因している可能性があります。スライドの大半に認められる場合は、染色後、スライドの液体カバースリップを洗い落とす際、脱イオン水または蒸留水と中性洗剤を使用することを推奨します。図3.25および図3.26を参照。

図3.23

乾燥不十分によるひび割れのアーチファクト

CC/Mount(水溶性封入剤)を十分に乾燥させないと、ひび割れのアーチファクトが生じることがある。このようなスライドは通常判定できる可能性があるが、ひび割れにより染色性や細胞の細部が不明瞭になっていないことを確認する必要がある。

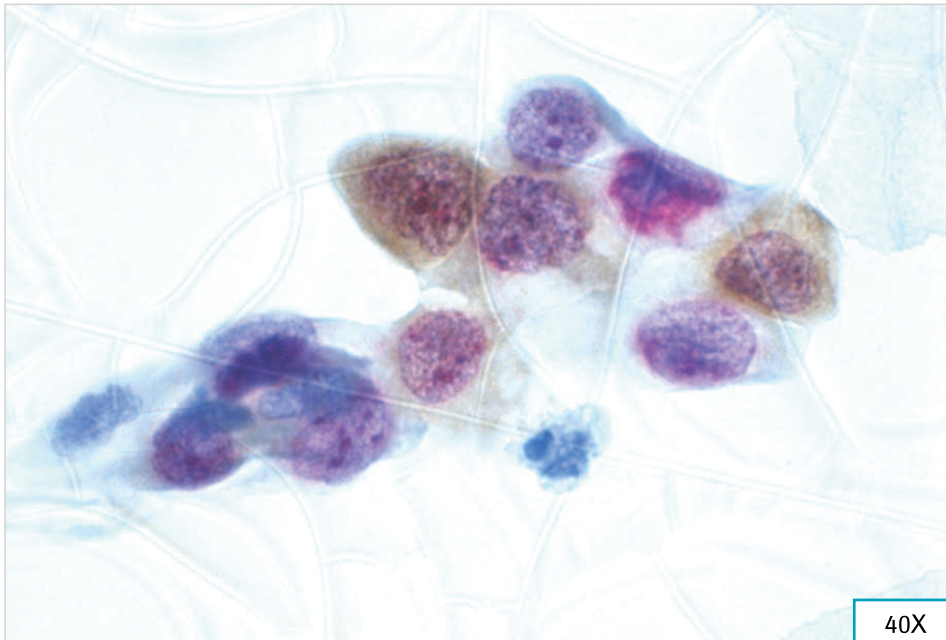


図3.24

封入マニュアルに従わず、自然乾燥させたことによる「コーンフレーク状」のアーチファクト

注意点: CINtec® PLUS Cytologyの染色スライドの封入は、水溶性封入剤を使用する必要がある。ファーストレッドはアルコールに溶解性で、アルコールに触れると退色する。CC/Mount(水溶性封入剤)を使用すると、低濃度から高濃度のアルコールに段階的につけて脱水する必要がなくなり、偽陰性の原因となる可能性のある赤色の退色を防ぐことができる。詳細は、CINtec® PLUS Cytologyの添付文書を参照。

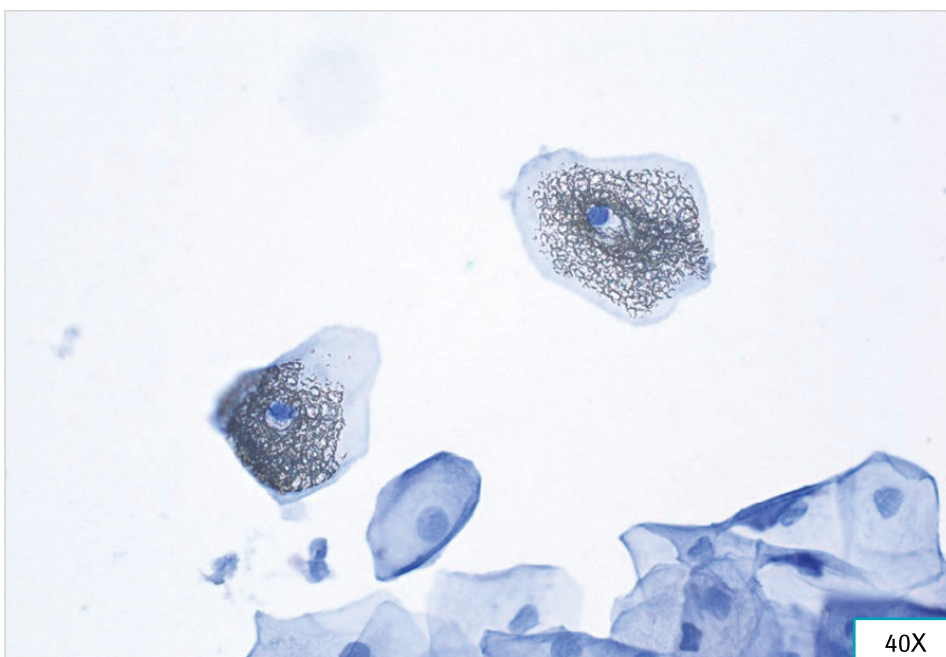
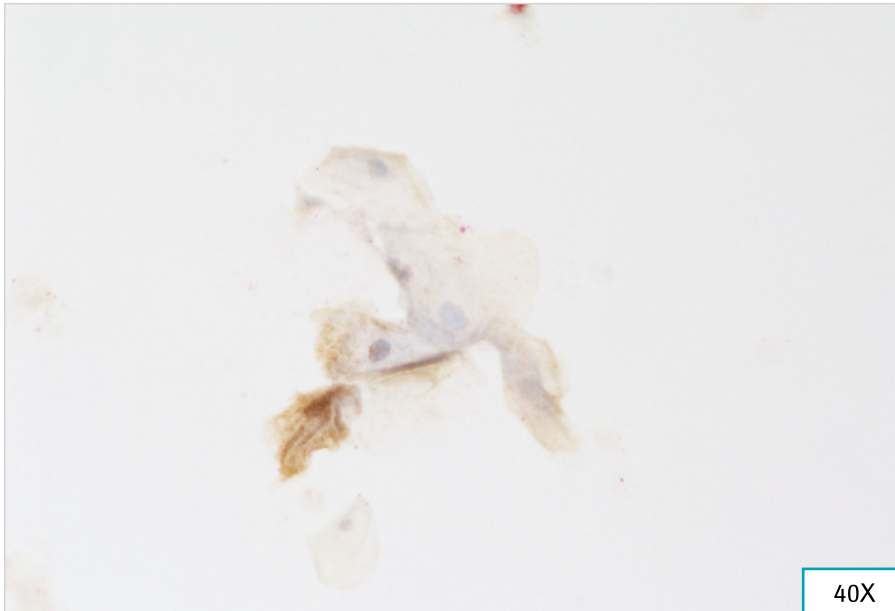


図3.25

茶色のバックグラウンド染色を伴った、コントロールの扁平上皮細胞の不均一な対比染色

このアーチファクトは、水道水の水質に起因している可能性がある。スライドの大半に認められる場合は、染色後のスライドから液体カバースリッスを洗い流す際、脱イオン水または蒸留水に中性洗剤を使用することを推奨する。

**図3.26**

茶色のバックグラウンドを伴った、コントロールの扁平上皮細胞の不均一な対比染色

このアーチファクトは、水道水の水質に起因している可能性がある。スライドの大半に認められる場合は、染色後のスライドから液体カバースリッスを洗い流す際、脱イオン水または蒸留水と中性洗剤を使用することを推奨する。



判定が困難な症例

染色結果の解釈や判定に困る症例があります。判定が困難な症例には、一般的に以下のような特徴があります。

- p16およびKi-67が共発現している細胞またはその疑いのある細胞数が少ない
- バックグラウンド染色が認められる
- さまざまな染色像を示す細胞集塊が認められる
- 特異的なp16およびKi-67の発現が弱い、あるいは濃い

CINtec® PLUS Cytology 標本をスクリーニングし、判定を行う際には、少なくとも1個のp16およびKi-67が共発現した細胞が認められることが検査陽性のカットオフとなります。弱いけれども特異的なp16の細胞質への発現やKi-67の核への発現が認められる細胞が少数の場合、特にコントロール細胞に非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められる場合は、陽性か陰性かの判定が難しいことがあります。細胞質に弱い特異的なp16の発現が認められ、核に弱い特異的な点状のKi-67の発現が認められる細胞が1~3個認められる標本を判定する際には、必ずp16およびKi-67の共発現が疑われる細胞の特異的なp16の発現強度をコントロール細胞と比較し、特異的な茶色の染色か非特異的な茶色のバックグラウンドの染色かを区別してください。

子宮頸部細胞の核内に認められる赤色の染色は、細胞質や細胞外に赤いスペキュリング(非特異的なバックグラウンド染色)が認められなければ、特異的なKi-67の発現とみなすことができます。p16およびKi-67が共発現した細胞が1~3個しか認められない場合は、結果が陽性であることを確認するため、Ki-67が均一に発現し、特異的なp16の発現が認められる細胞を見つけることを推奨します。また、細胞質に特異的なp16の発現が認められ、核に特異的な点状または部分的なKi-67の発現が認められる共発現した細胞が1~3個認められたものの、いずれの共発現した細胞にも均一なKi-67の発現が認められない場合は、点状または部分的なKi-67の核への発現が認められる共発現した細胞に基づいて陽性と判定します。

細胞質と核に強い特異的なp16の発現が認められるp16およびKi-67が共発現した細胞も、評価が難しいことがあります。茶色のp16の発現が強いため核や細胞質の色が濃く見え、特異的な赤色のKi-67の発現を評価するのが難しくなります。その場合は、顕微鏡の電圧を上げると、核に赤色の染色が認められるかどうか判定しやすくなります。

細胞集塊は判定が難しいことがありますが、特異的なp16およびKi-67の発現か判定が困難な細胞集塊を含む症例の評価には、CINtec® PLUS Cytologyの細胞集塊判定アルゴリズムを参照下さい。

図4.0

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質に弱いp16の発現が認められ、核に弱いKi-67の発現が認められる細胞

共発現した細胞の細胞質に認められるp16の発現は、茶灰色のバックグラウンド染色とは色味が異なり、コントロール細胞全体に認められる茶色のバックグラウンド染色よりも濃い染色性を示す。赤色の核の染色性は強くないものの、シグナルが細胞核内に認められることから、特異的な染色とみなされる。この標本には、p16およびKi-67が共発現した細胞はこれ1個のみしか認められない。

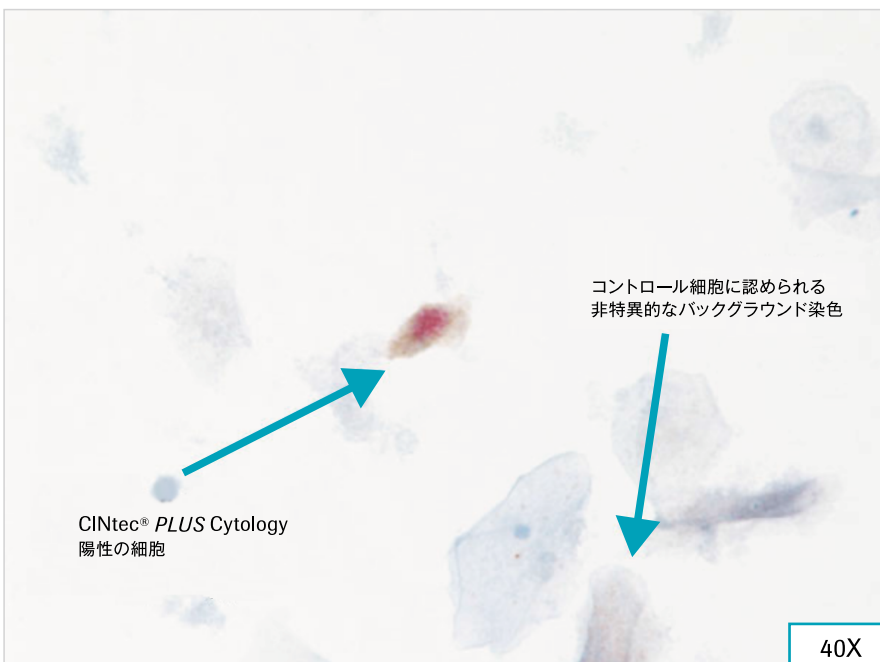
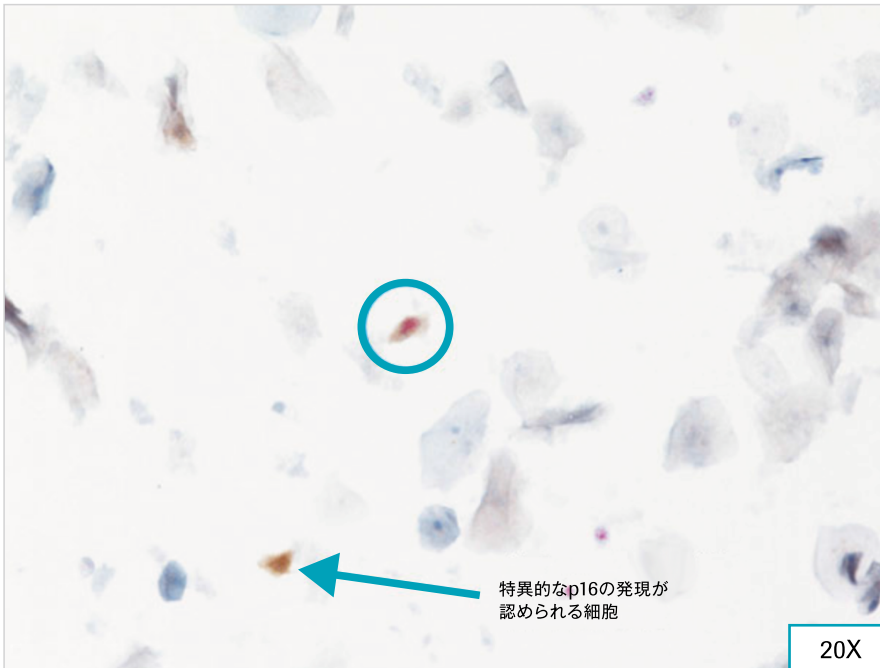


図4.1

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質に弱いが特異的なp16の発現が認められ、核に点状、顆粒状の赤色の染色が認められる共発現した細胞

この細胞の細胞質や他のコントロール細胞または細胞外には点状の赤色の染色が認められないことから、この顆粒状または点状の赤色の染色は特異的なKi-67の発現とみなされる。共発現した細胞の細胞質に認められるp16の発現は弱いものの、周囲のコントロール細胞には明らかな非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められず比べても染色強度が高い。この標本上で認められる共発現した細胞はこの細胞のみである。本症例は、この1個のp16およびKi-67が共発現した細胞に基づき、CINtec® PLUS Cytology 陽性と判定される。

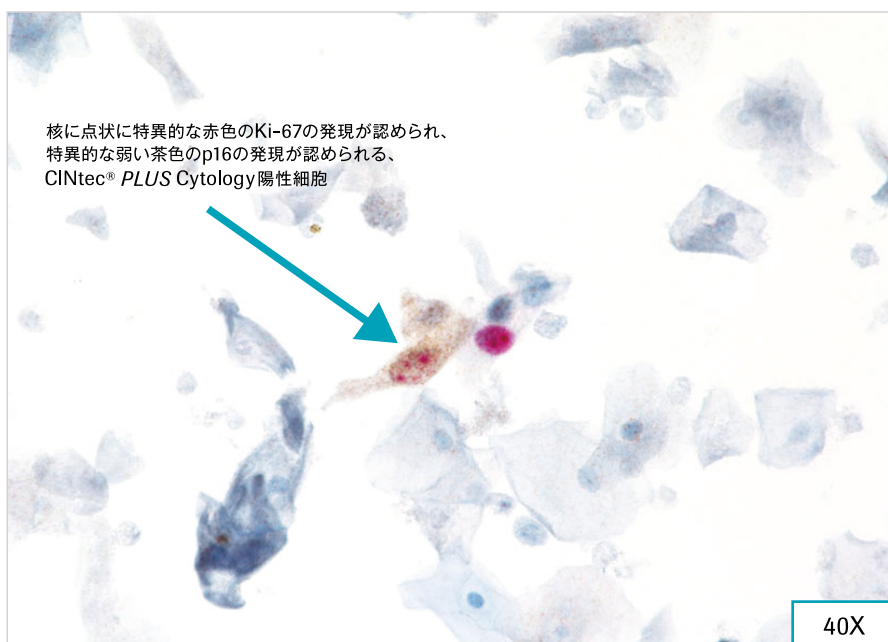


図4.2

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質と核の両方にp16の発現が認められ、核に弱いKi-67の発現が認められる、単一の共発現した細胞

核内に赤色のKi-67の発現が認められ、この核には茶色のp16の発現も認められる。核にKi-67の発現とp16の発現の両方が認められる細胞を評価する際には、特異的なKi-67(赤色)の発現かを確認するために顕微鏡の光量をあげる必要があることがある。この症例では、コントロール細胞に非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められないため、共発現した細胞における細胞質の特異的なp16の発現が判定しやすくなっている。本症例は、この共発現した単一の細胞に基づき、CINtec® PLUS Cytology 陽性と判定される。

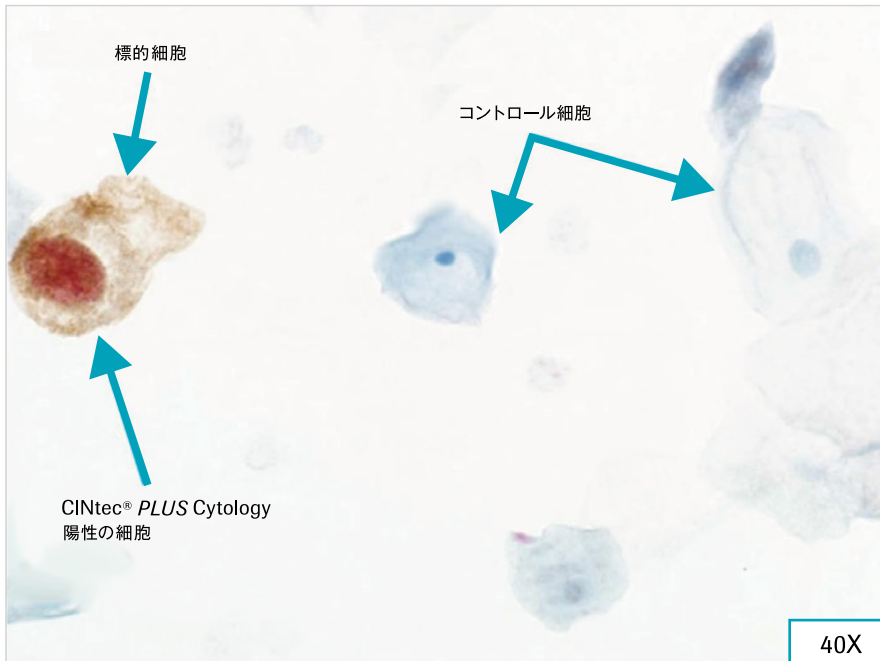


図4.3

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質に弱いp16の発現が認められ、核に弱いKi-67の発現が認められる、単一のCINtec® PLUS Cytology 陽性細胞

共発現した細胞の細胞質に認められるp16の発現は、コントロール細胞に認められる茶灰色のバックグラウンド染色とは色調が異なり、全体に認められる茶色のバックグラウンド染色よりも染色強度が強い。

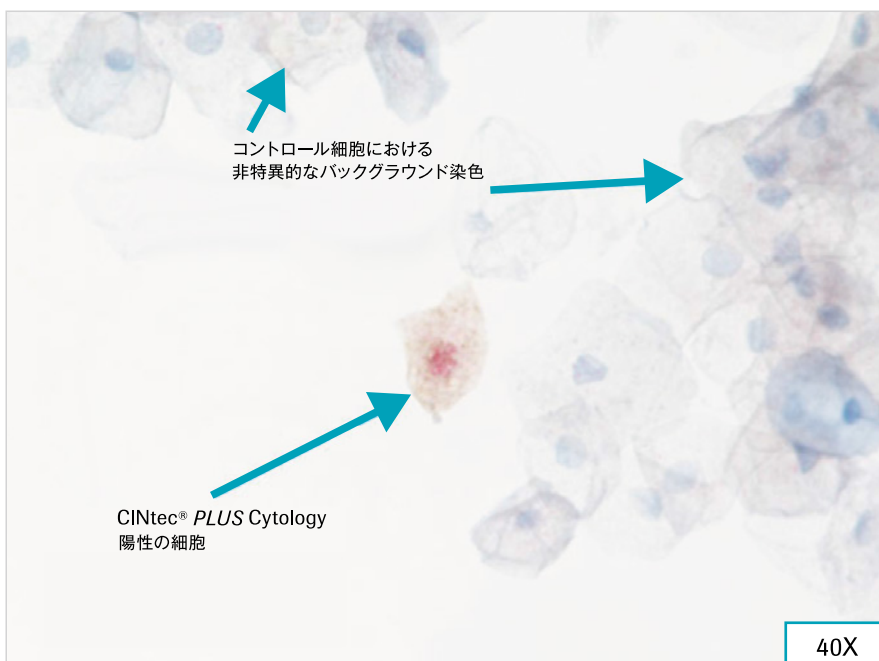
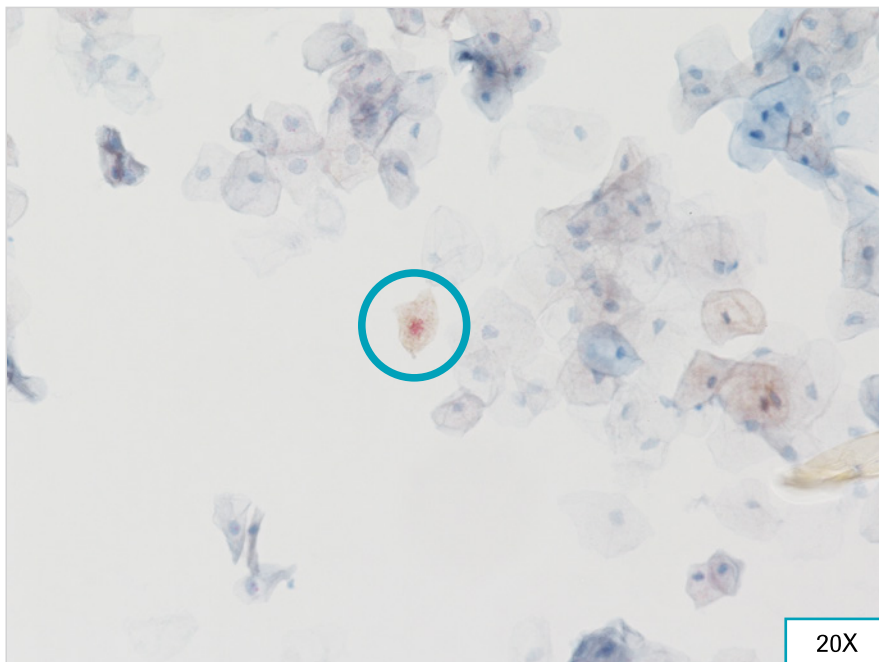


図4.4

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質に弱いp16の発現が認められる2個の共発現した細胞(丸で囲んだ部分)

左側の細胞にはKi-67の弱い発現が認められ、右側の細胞の核にはKi-67の中程度の発現が認められる。この症例はCINtec® PLUS Cytology陽性である。コントロール細胞に明かな茶色のバックグラウンド染色が認められないため、共発現した細胞における弱い特異的なp16の発現が判定しやすくなっている。非特異的な赤いスペキュリングは、コントロール細胞の細胞質や細胞外には認められない。

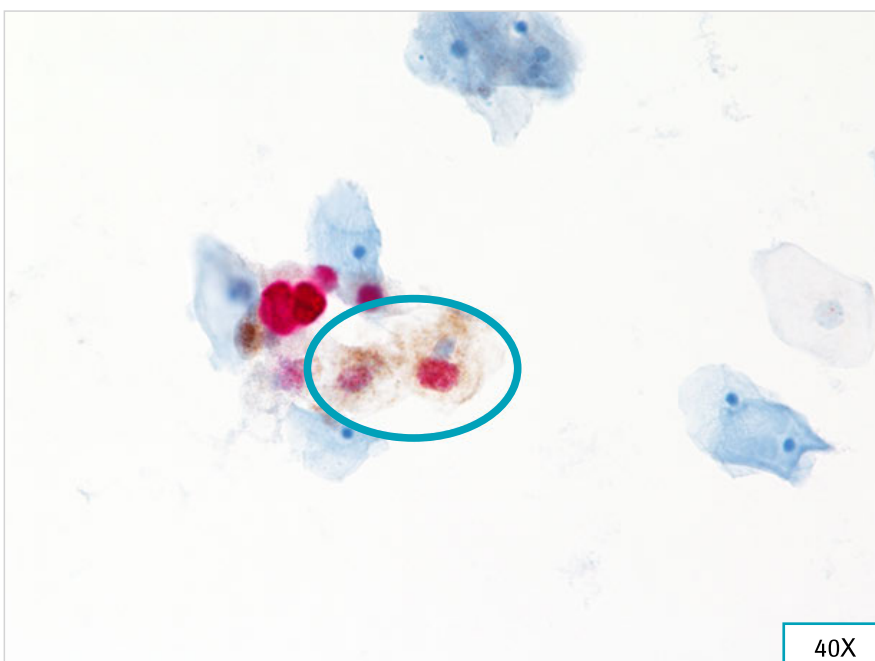
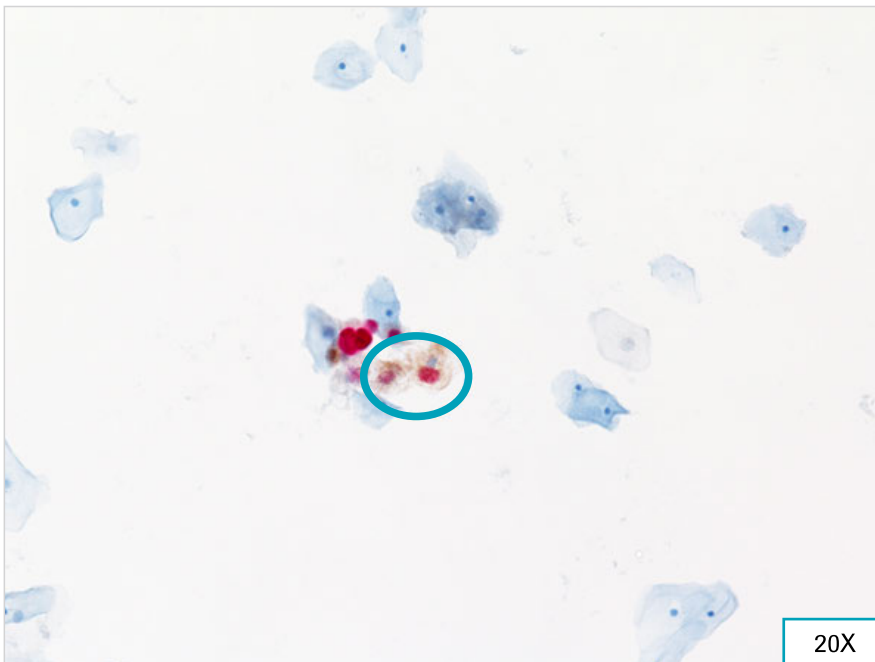


図4.5

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質にp16の発現が認められ、核にKi-67の発現が認められる、単一の共発現した細胞

この共発現した細胞は、N/C比が比較的高いものの、細胞質のp16の発現が確認できる。細胞質のp16の発現は、コントロール細胞に認められるバックグラウンド染色より濃くなっている。p16およびKi-67が共発現した細胞の右側には、特異的なp16の発現が認められる細胞が1個みられる。

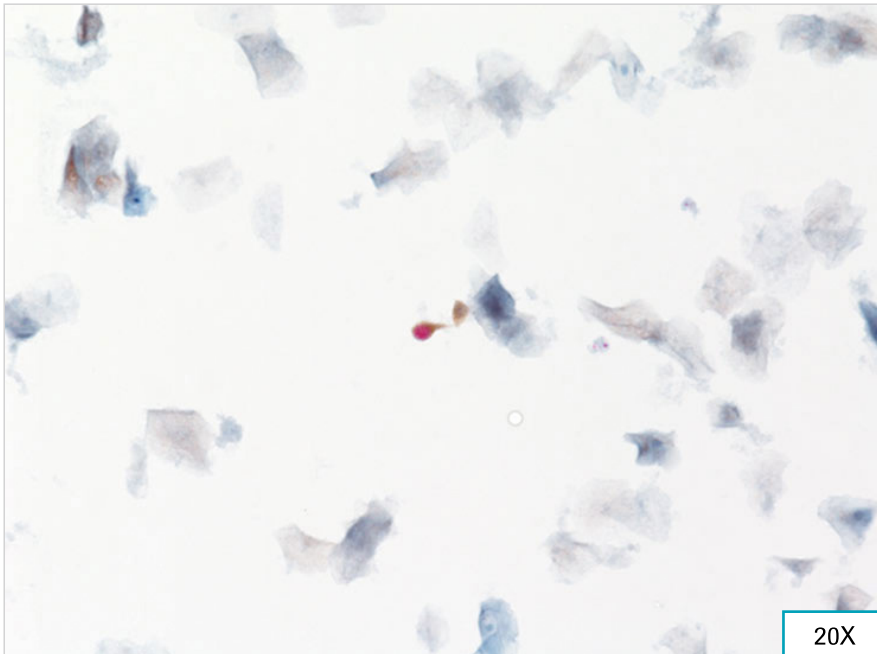




図4.6

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

細胞質に弱い特異的なp16の発現が認められ、核に特異的なKi-67の発現が認められる、2個の共発現した細胞

共発現した細胞の細胞質に認められるp16の発現は、コントロール細胞全体に認められる茶色のバックグラウンド染色とは色調が異なり、わずかに濃い染色性を示す。コントロール細胞の細胞質に非特異的なバックグラウンド染色として赤いスペキュリングが認められるが、共発現した細胞の核には均一なKi-67の発現を認めるため判定の妨げにはならない。

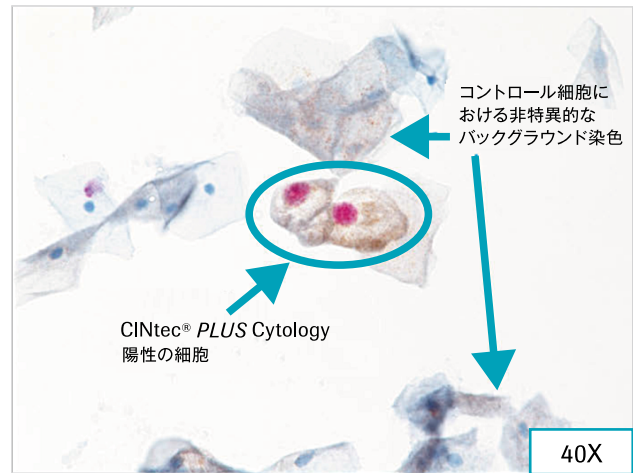


図4.7

CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

p16およびKi-67が共発現した2個の細胞(丸で囲んだ部分)

右側の共発現した細胞の方が判定が難しい。この細胞の細胞質には、特異的だが弱いp16の発現が認められる。この細胞の核には、弱い部分的な赤色の染色が認められ、これは特異的なKi-67の発現と考えられる。コントロール細胞にはあきらかな非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められないため、弱い特異的なp16の発現が判定しやすくなっている。コントロール細胞の細胞質や細胞外に、非特異的な赤いスペキュリングは認められない。

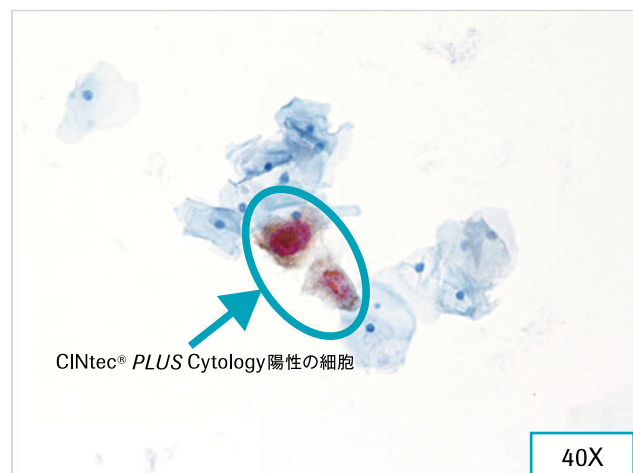
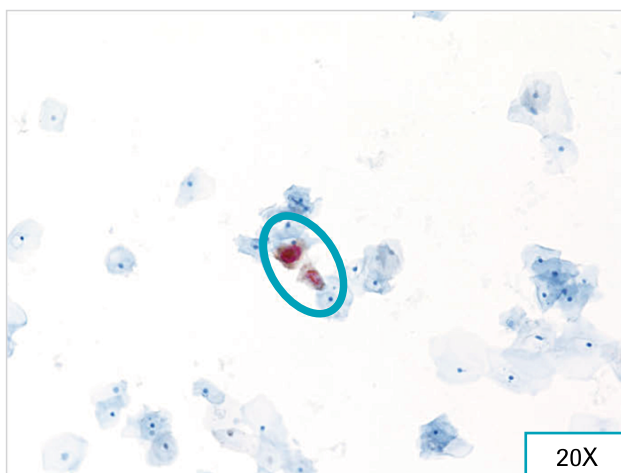


図4.8

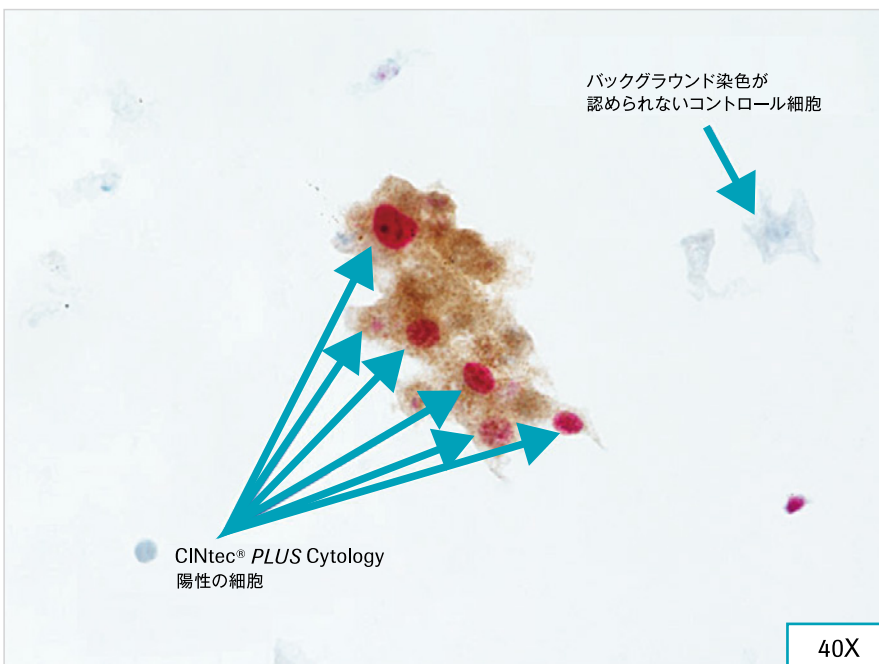
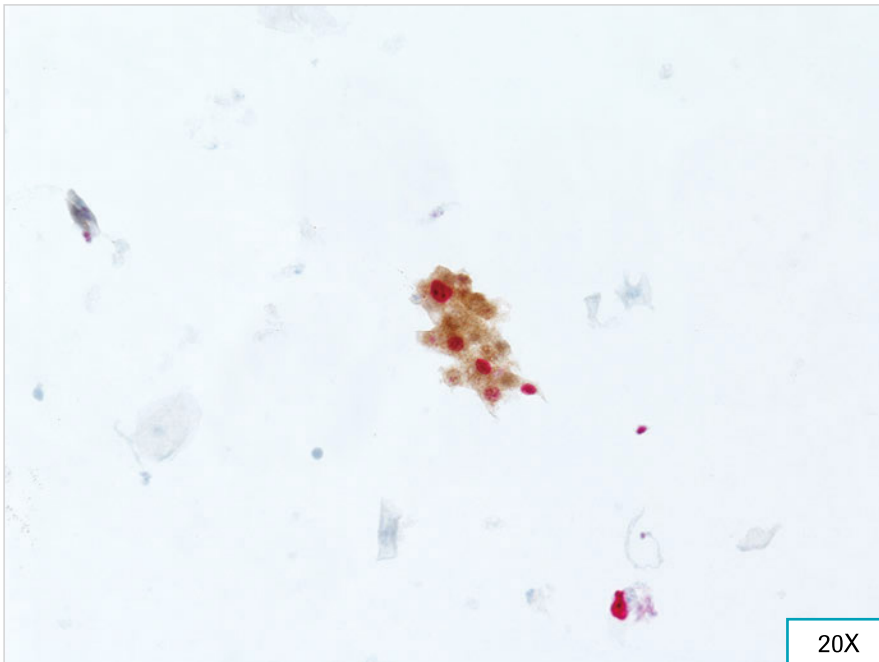
核に特異的なKi-67の発現が認められ、p16の発現の疑いのある、共発現の可能性が疑われる孤立した細胞を認める。細胞質に弱い茶色の染色が認められる領域があるが、これはコントロール細胞に認められるバックグラウンド染色と濃さが変わらないように見える。この茶色の細胞質の染色は特異的なp16の発現ではないように見え、細胞質が折り畳まれている部分があることから、茶色のバックグラウンド染色が強められている可能性がある。標本全体で評価対象とする細胞をこの細胞のみとした場合、この症例はPLUS Cytology陰性とみなされる。コントロール細胞にバックグラウンド染色が認められ、これは丸で囲んだ細胞における茶色の染色と同様であるように見えることから、この細胞を共発現した細胞として判定するには注意が必要である。



図4.9

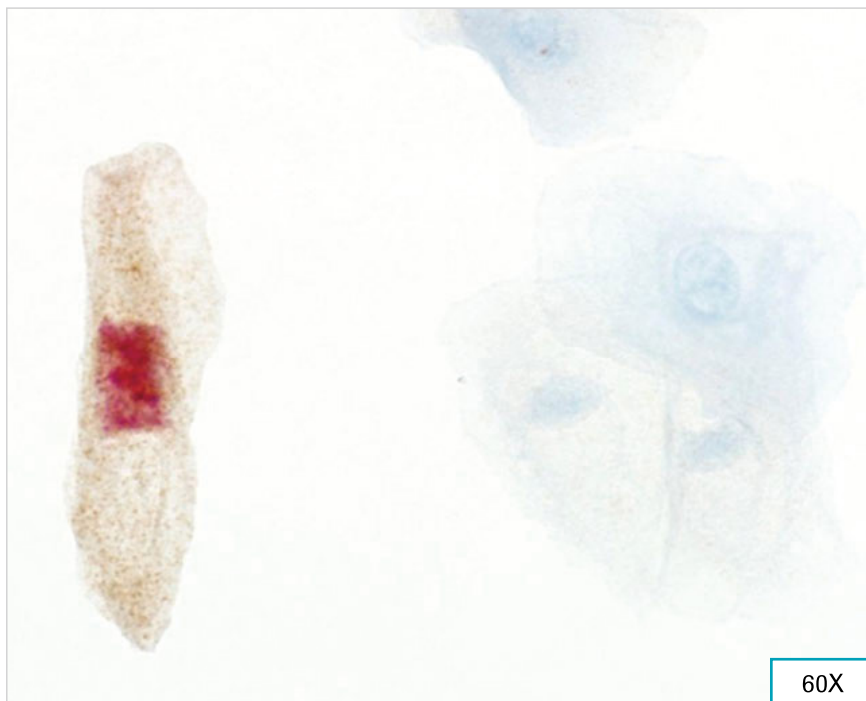
CINtec® PLUS Cytology 陽性例:

特異的なp16およびKi-67の発現が認められる共発現した細胞が集塊辺縁部に多数認められる細胞集塊。この細胞集塊はCINtec® PLUS Cytology陽性であり、びまん性のp16の発現も認められる。コントロール細胞には非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められないため、集塊辺縁部の細胞の弱いp16の発現が評価しやすくなっている。共発現した細胞の核の染色強度はさまざまで、強いKi-67の発現が認められる核もあれば、弱い点状のKi-67の発現が認められる核もある。

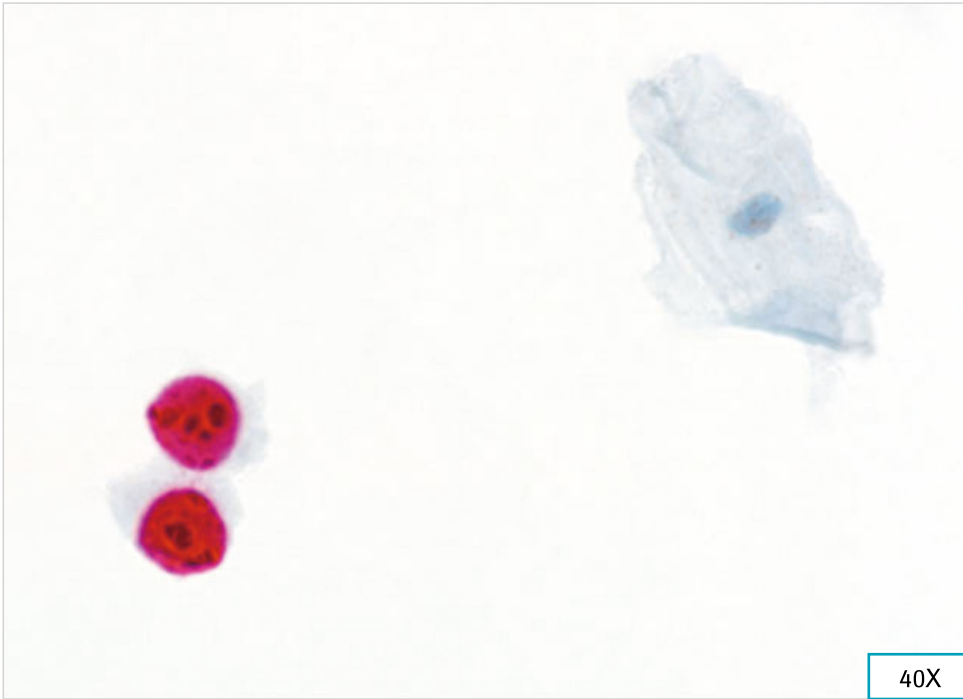


確認テスト

以下の症例について、CINtec® PLUS Cytology陽性か陰性かを判定してください。
解答は次の項にあります。

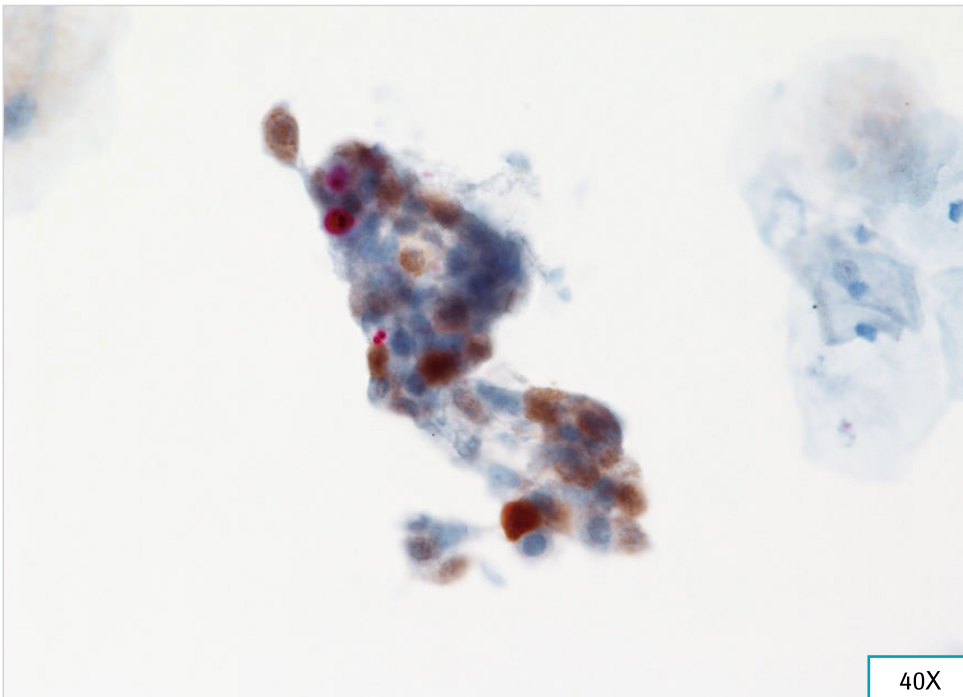


1. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



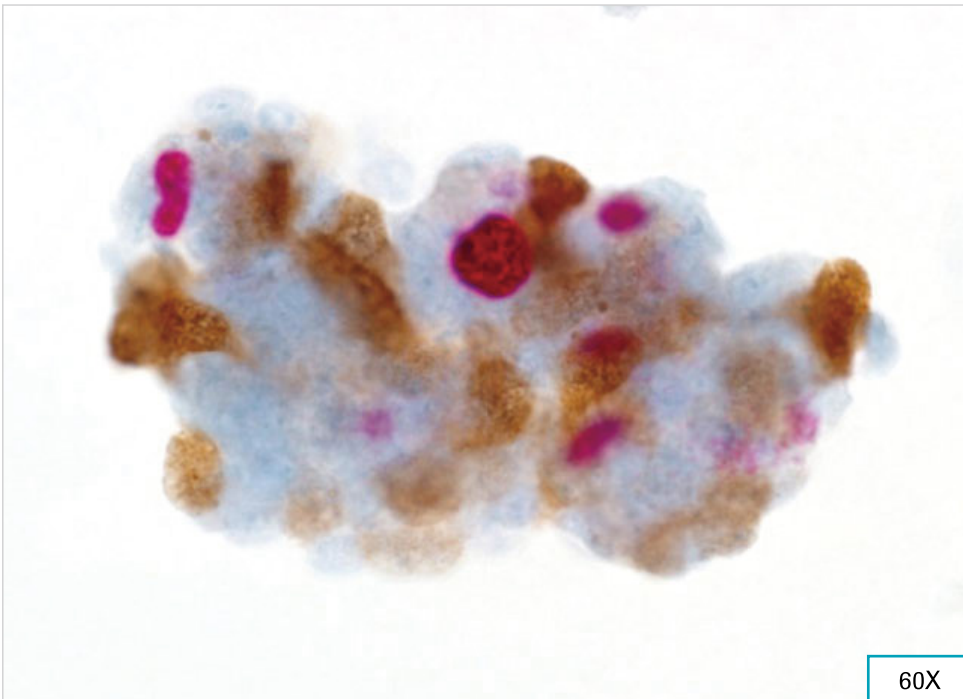
40X

2. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性

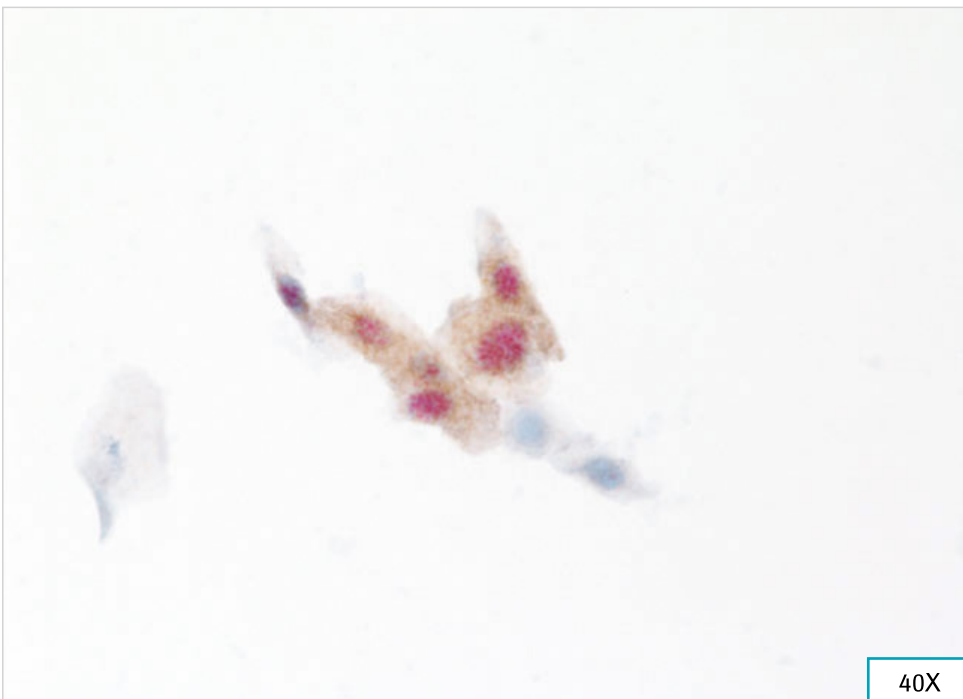


40X

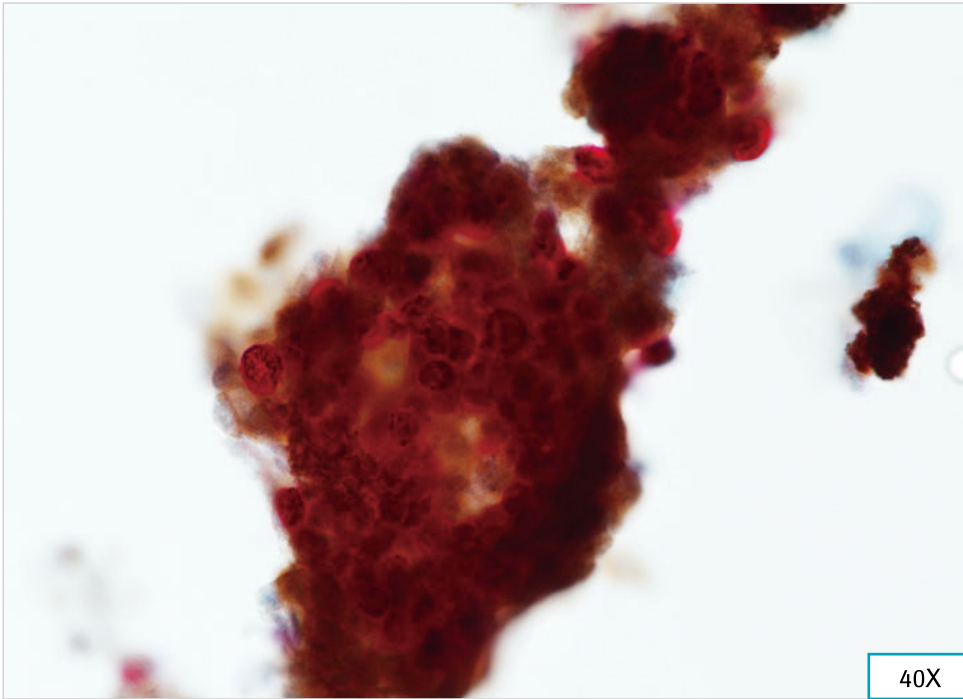
3. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



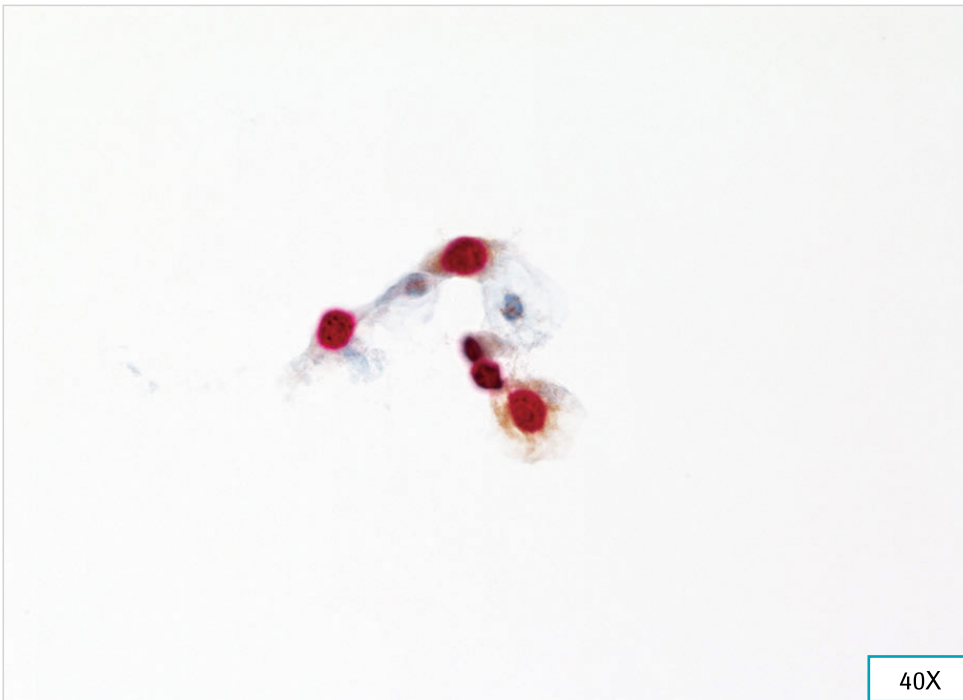
4. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



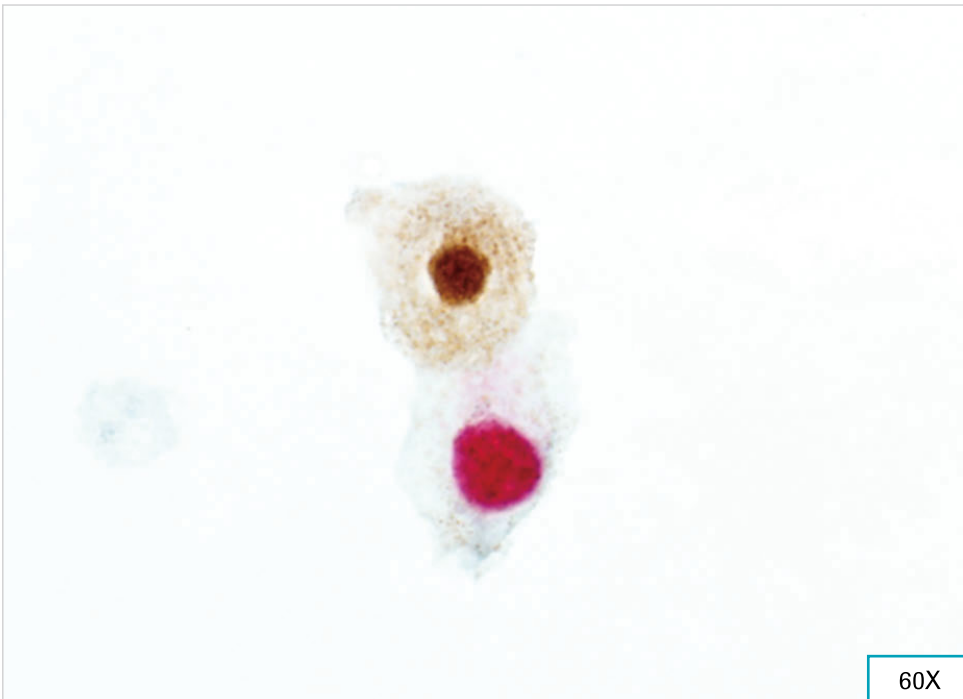
5. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



6. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性

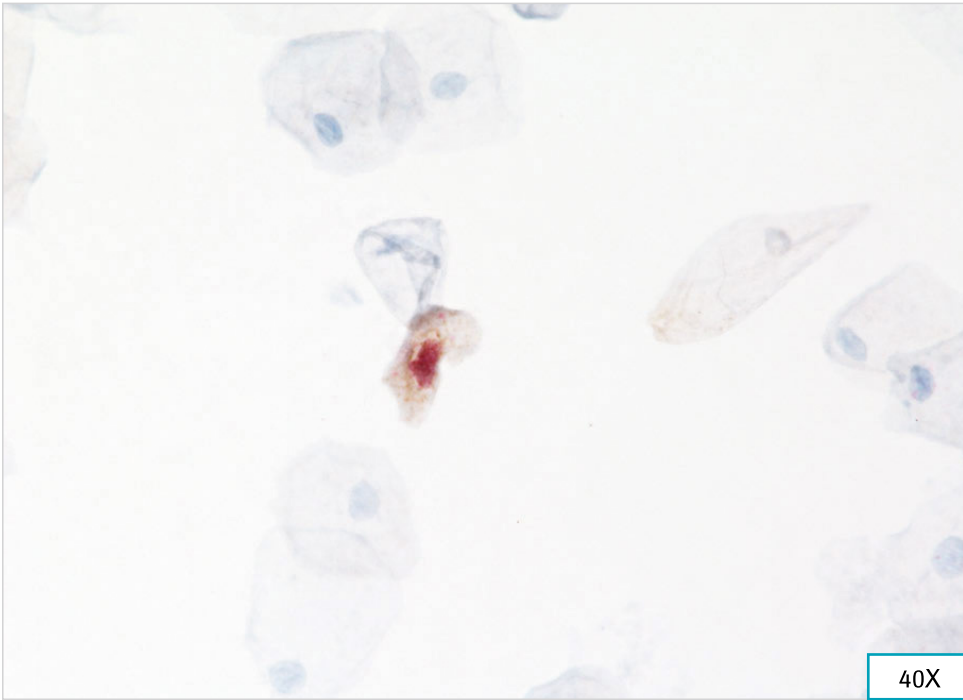


7. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



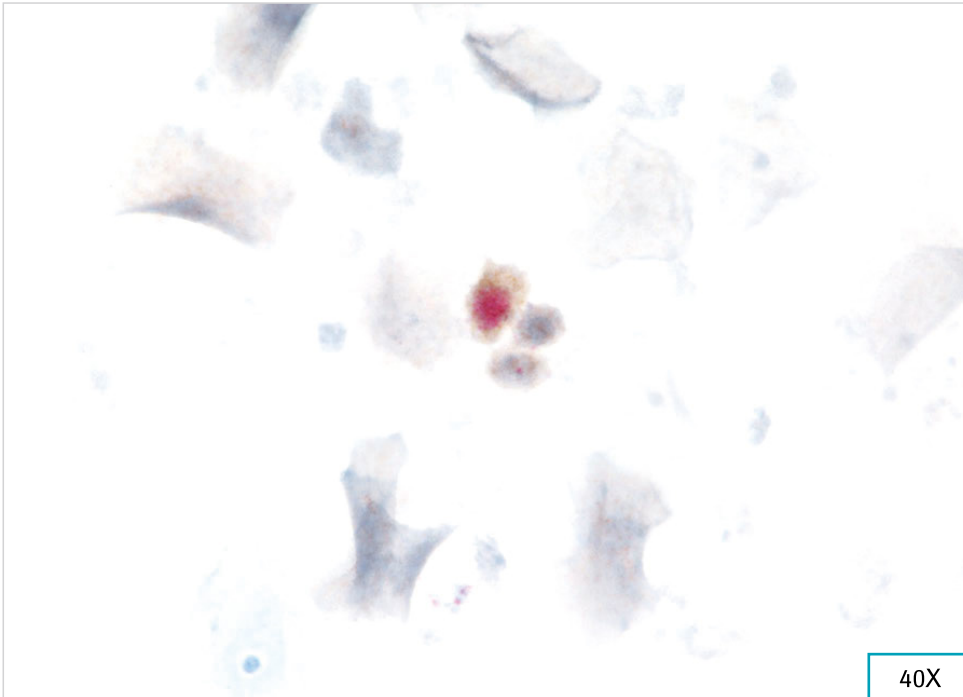
60X

8. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性

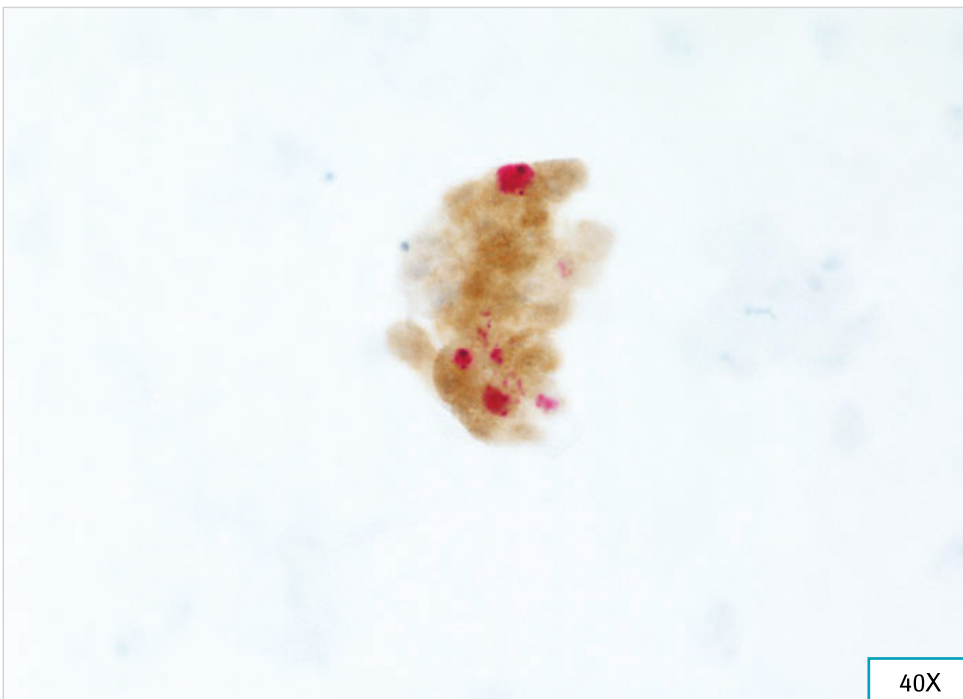


40X

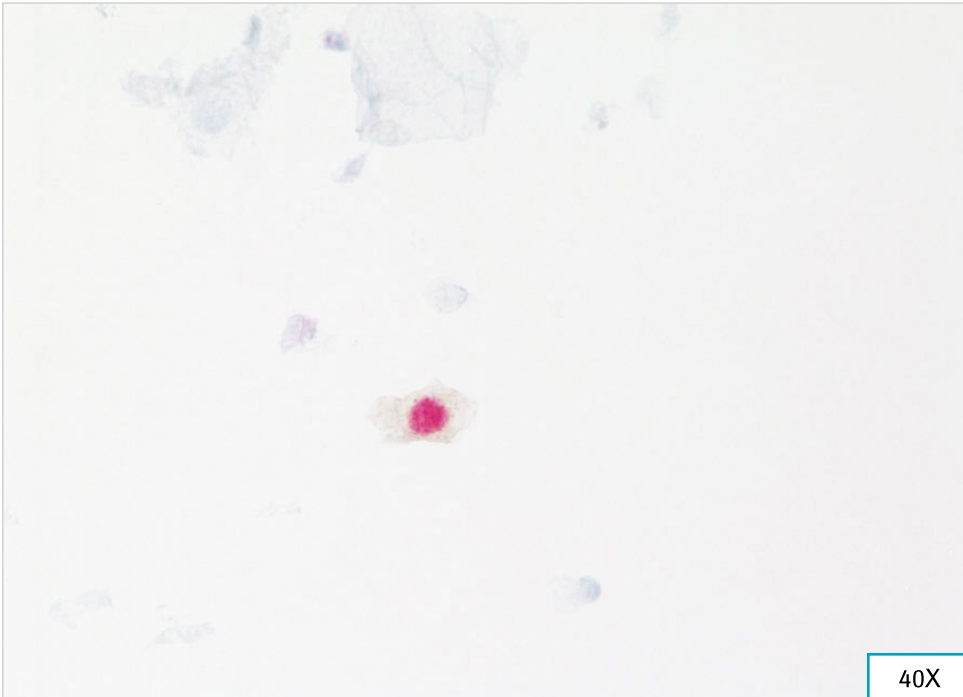
9. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



10. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性

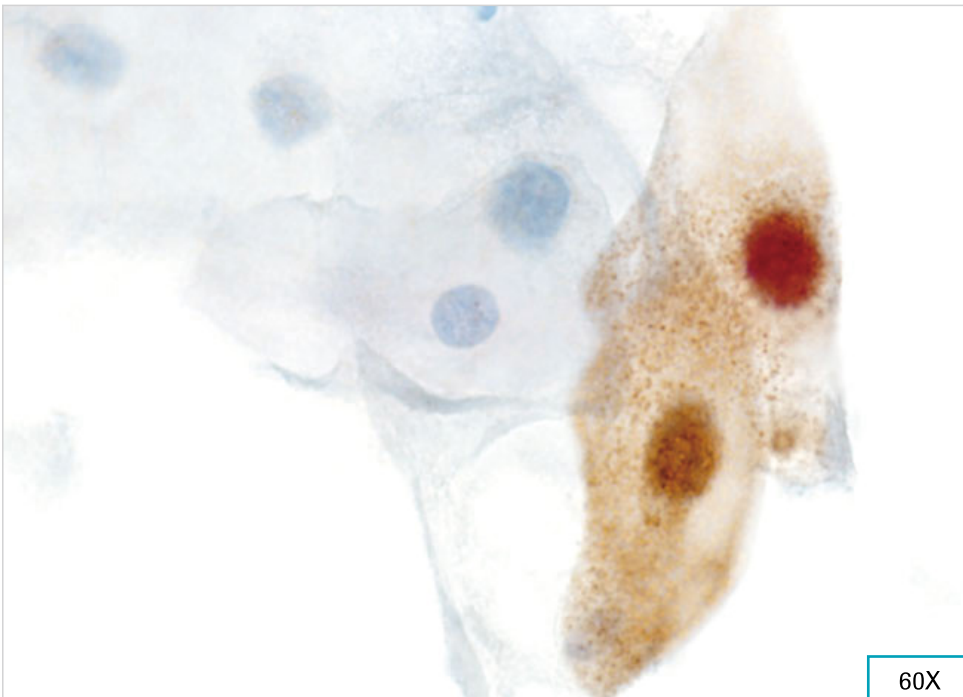


11. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



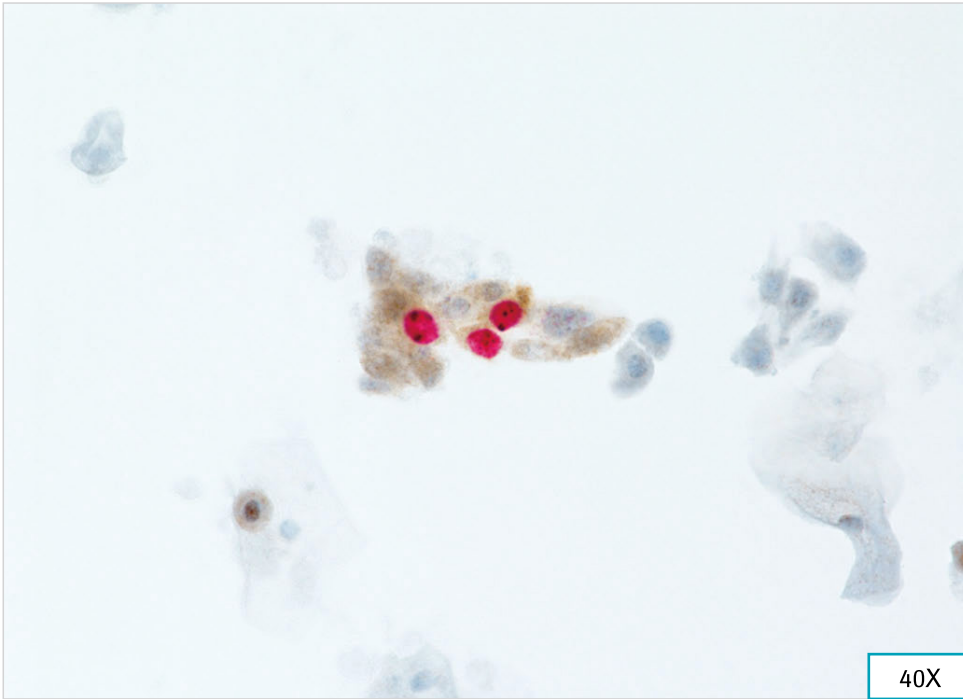
40X

12. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性



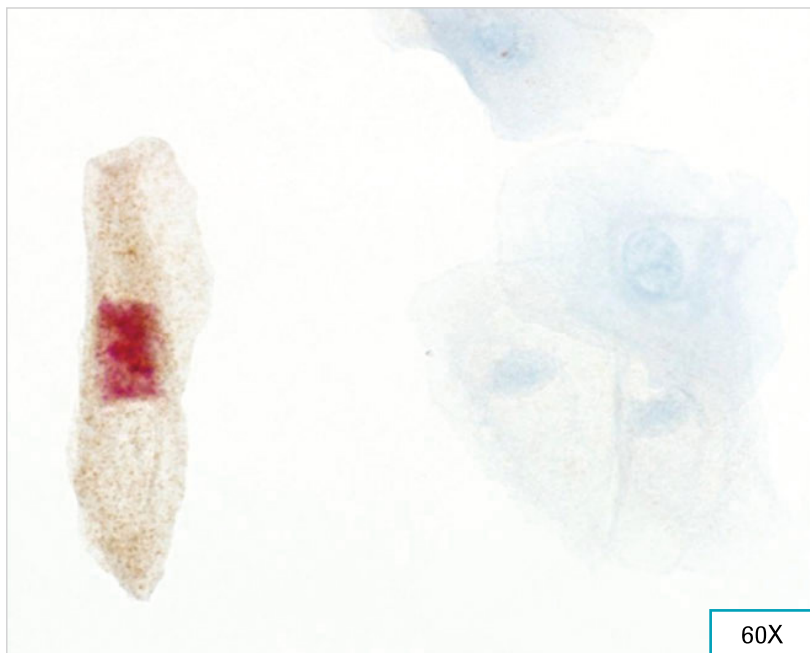
60X

13. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性

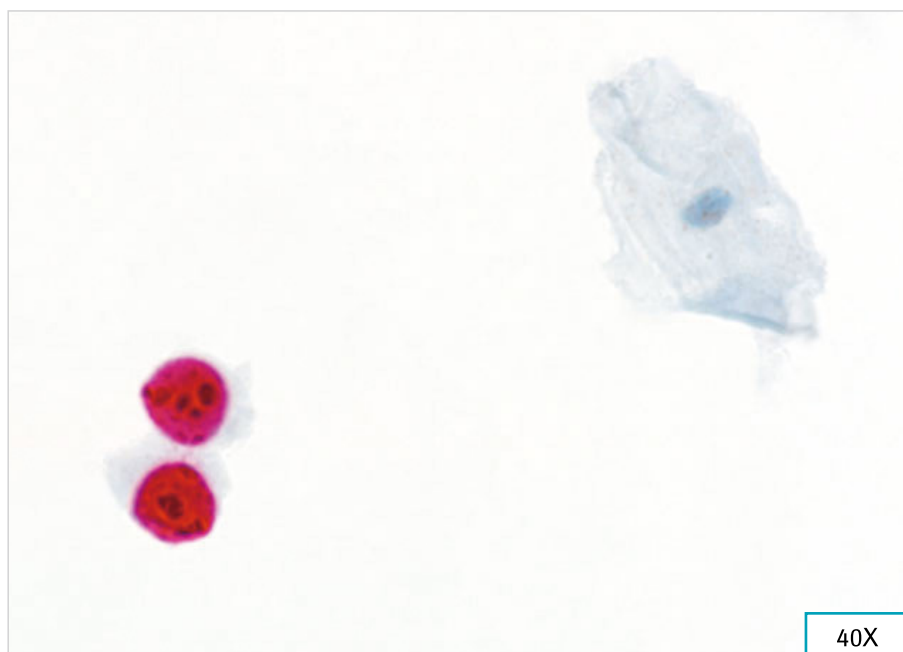


14. CINtec® PLUS Cytology : 陽性 陰性

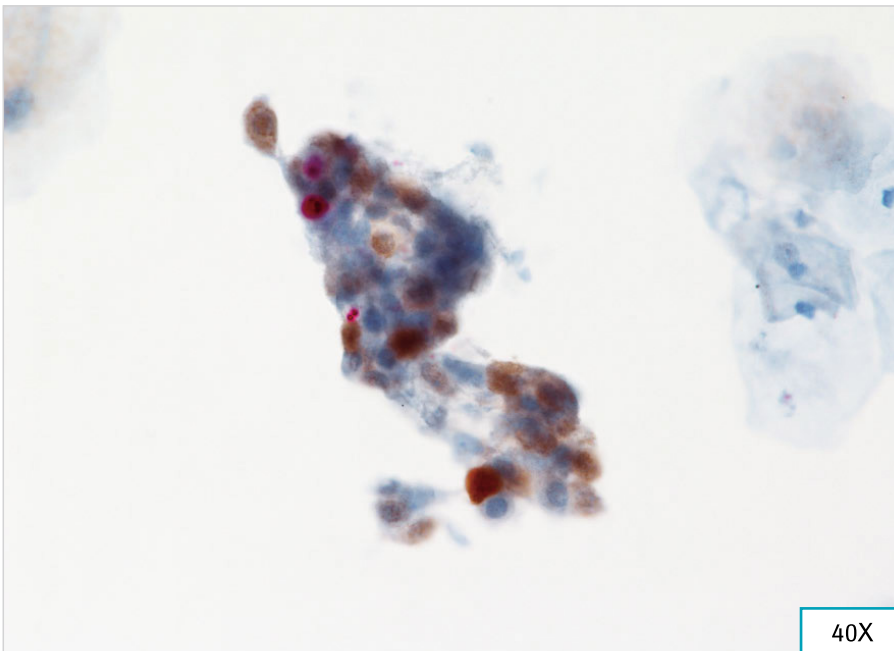
確認テストの解答



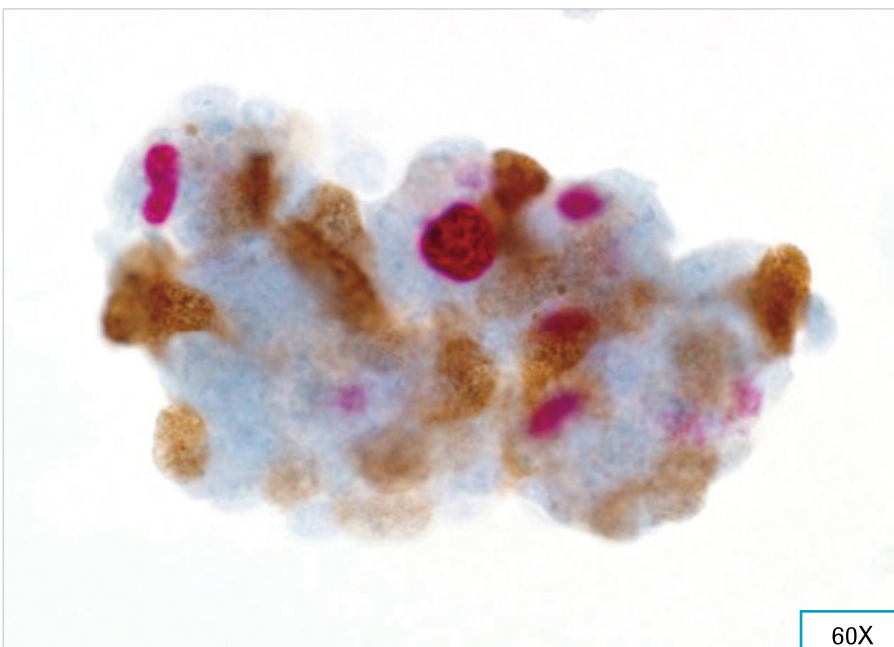
1. p16(茶色)およびKi-67(赤色)が共発現した扁平上皮細胞が1個認められ、CINtec® PLUS Cytology陽性である。



2. 2個の扁平上皮化生細胞に、特異的なKi-67(赤色)の発現のみが認められる。いずれの細胞もCINtec® PLUS Cytology陰性である。



3. 限局性のp16の発現と、いくつかの細胞の核にKi-67の発現が認められる扁平上皮細胞の集塊であり、CINtec® PLUS Cytology陰性である。

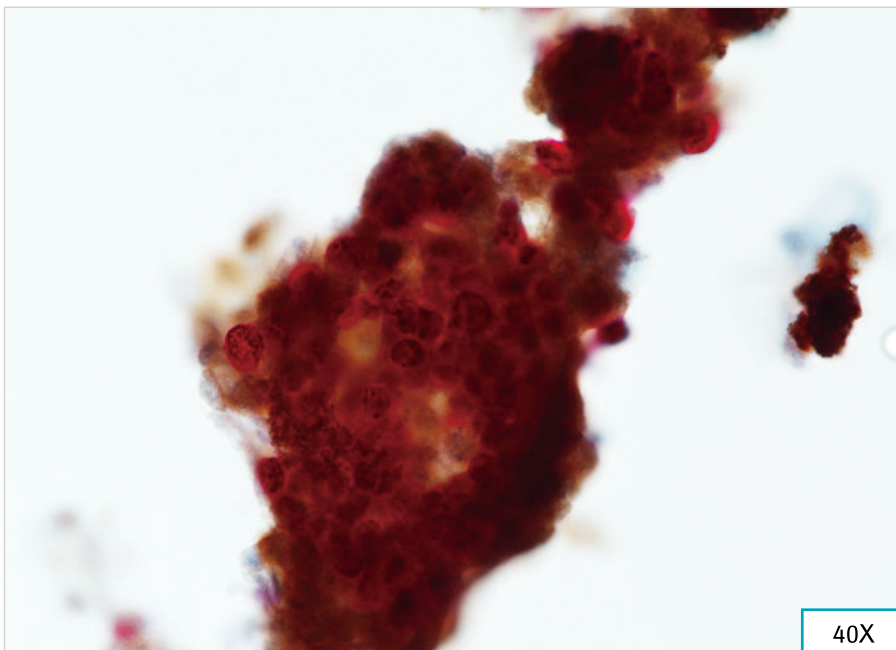


4. 限局性の特異的なp16の発現と、核にKi-67の発現が認められるが、集塊辺縁部に共発現した細胞が認められない細胞集塊であり、CINtec® PLUS Cytology陰性である。

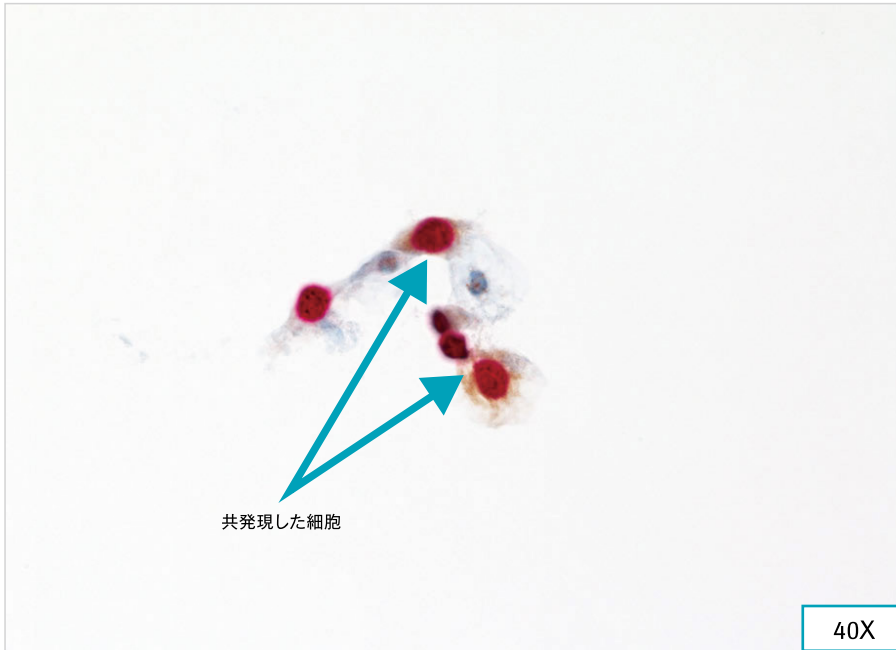


5. 弱い特異的なp16の発現と、核に弱い特異的なKi-67の発現が認められる扁平上皮細胞のシート状集塊であり、CINtec® PLUS Cytology陽性である。

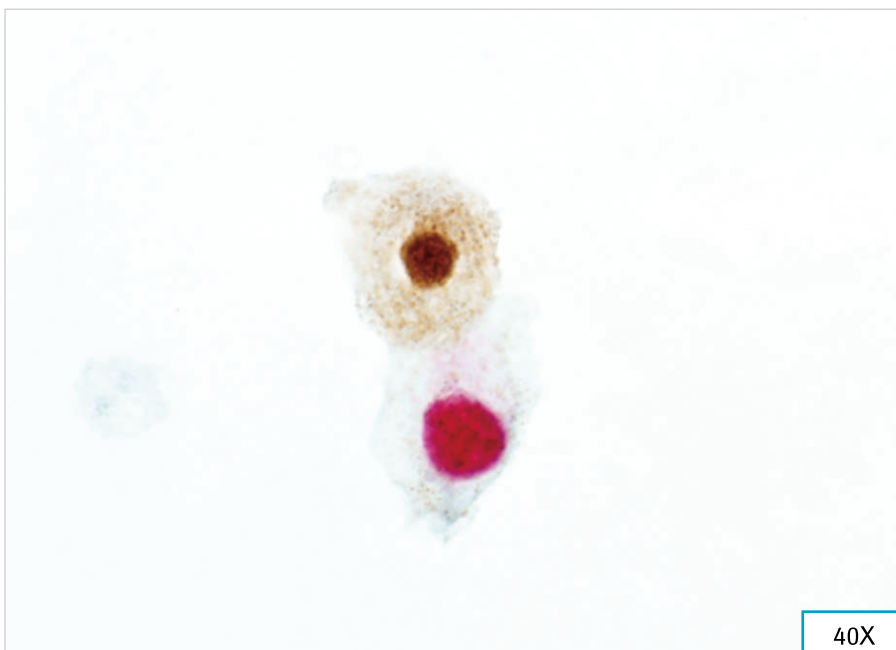
コントロール細胞にはあきらかな非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められないため、シート状の細胞集塊の弱い特異的なp16の発現を評価しやすい。



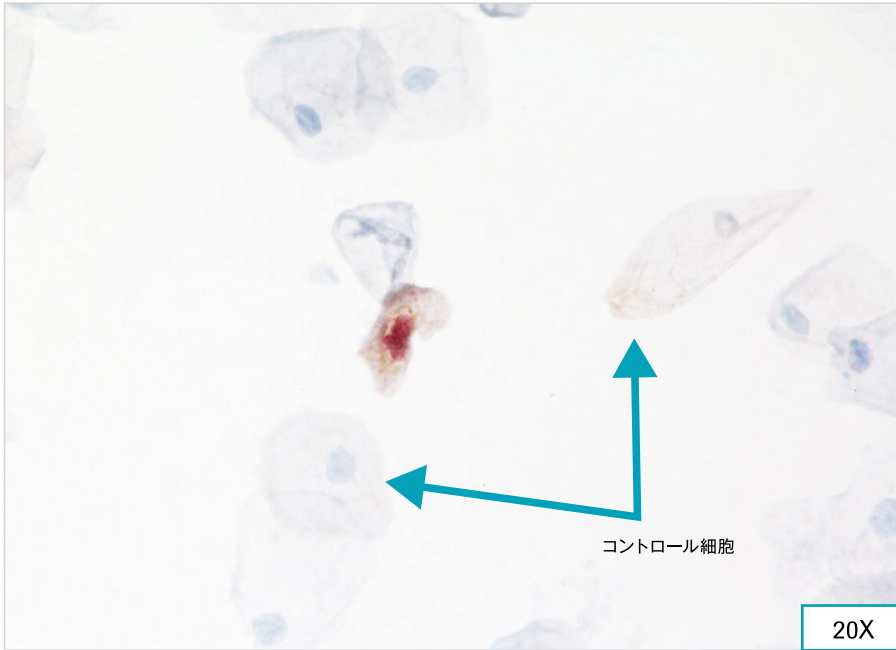
6. 見分けづらいが集塊辺縁部に共発現した細胞が認められる腺細胞の集塊である。強いびまん性の特異的なp16の発現と、集塊に内包されている核には強い特異的なKi-67の発現が認められ、CINtec® PLUS Cytology陽性である。



7. 細胞質に弱いが特異的なp16の発現が認められ、核にKi-67(赤色)の発現が認められる。共発現した扁平上皮細胞が2個認められ、CINtec® PLUS Cytology陽性である。

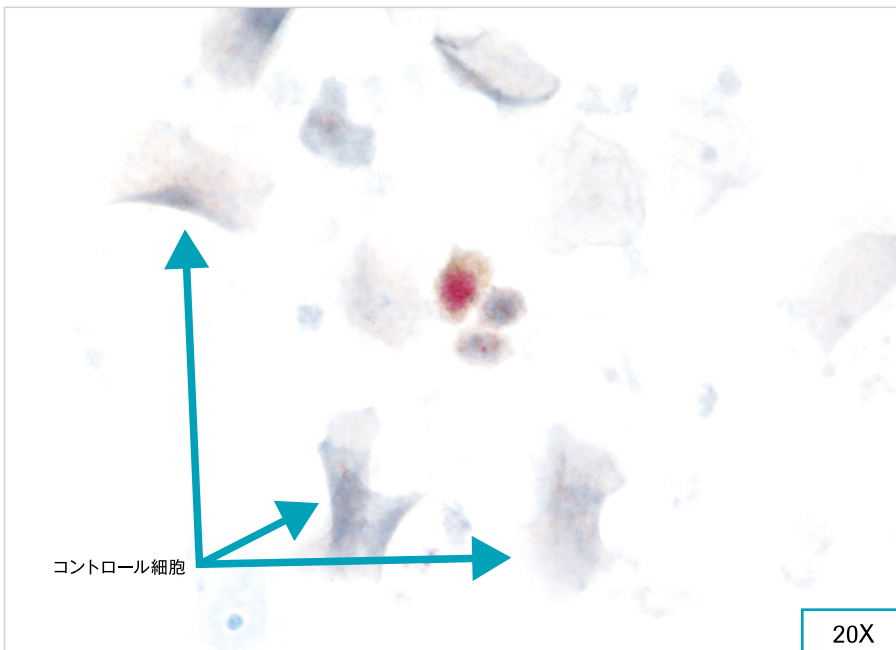


8. 2個の扁平上皮細胞：(上)細胞質と核に特異的なp16の発現のみが認められる、(下)核にKi-67の発現が認められる—いずれの細胞もCINtec® PLUS Cytology陰性である。



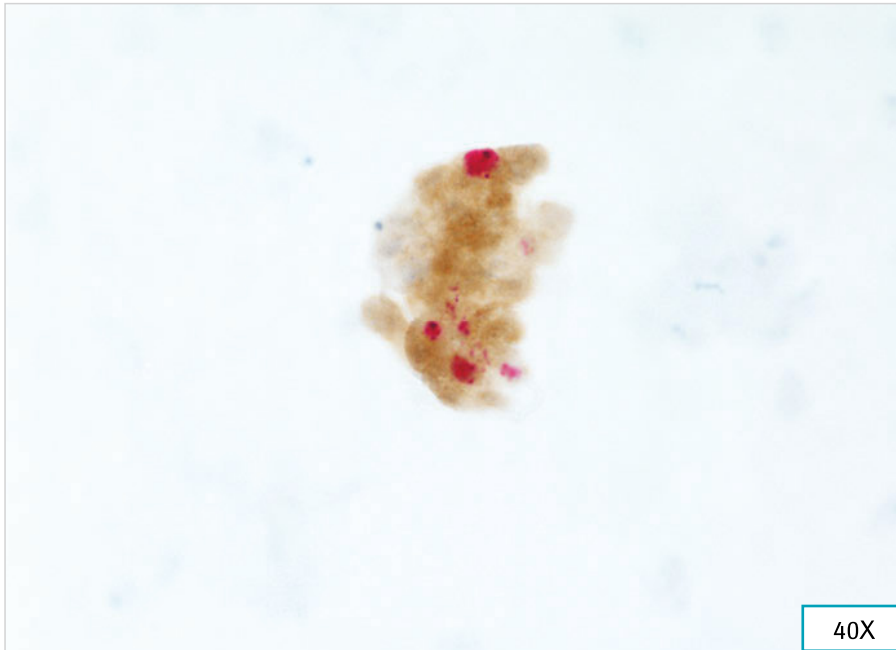
9. 細胞質に弱い特異的なp16の発現および、核に弱いKi-67の発現が認められる共発現した細胞であり、CINtec® PLUS Cytology陽性である。

共発現した細胞の細胞質に認められるp16の発現は、茶灰色のバックグラウンド染色とは色味が異なり、コントロール細胞全体に認められる茶色のバックグラウンド染色よりも染色強度が強い。



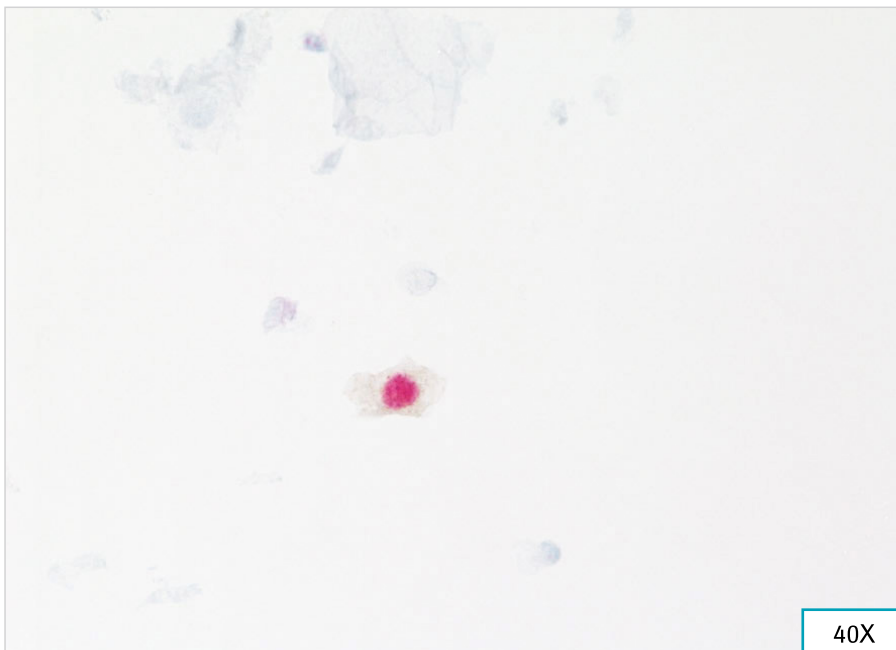
10. 細胞質に弱い特異的なp16の発現が認められ、核に弱いKi-67の発現が認められる共発現した細胞であり、CINtec® PLUS Cytology陽性である。

共発現した細胞の細胞質に認められるp16の発現は、茶灰色のバックグラウンド染色とは色味が異なり、コントロール細胞全体に認められる茶色のバックグラウンド染色よりも染色強度が強い。



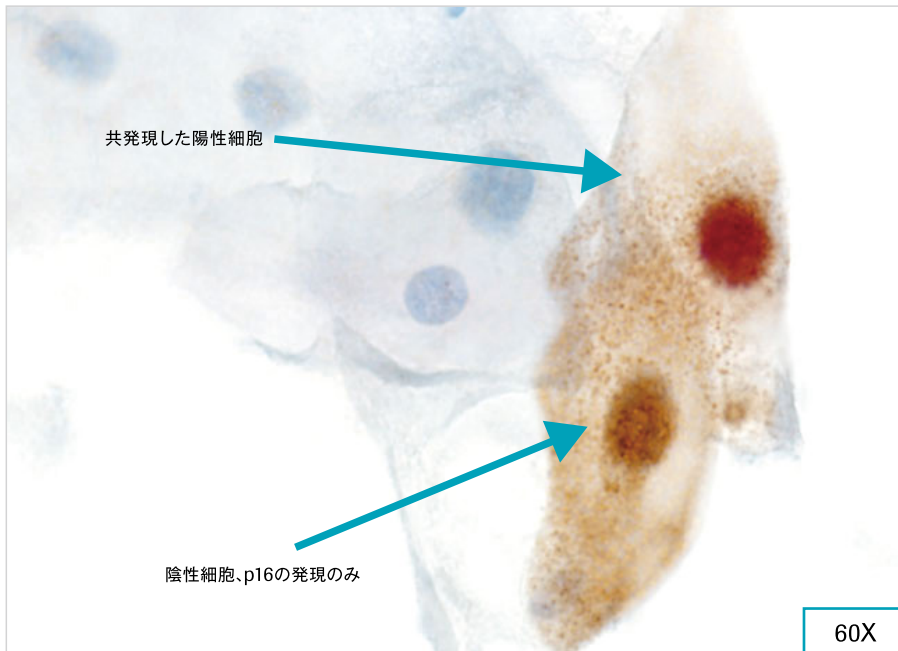
11. 共発現した細胞が集塊辺縁部に認められ、びまん性の特異的なp16の発現と、集塊に内包されているいくつかの核に強い特異的なKi-67の発現が認められる扁平上皮細胞集塊であり、CINtec® PLUS Cytology陽性である。

この細胞集塊には赤色の点状のアーチファクトが認められるが、このアーチファクトを特異的なKi-67の核への発現とみなしてはならない。



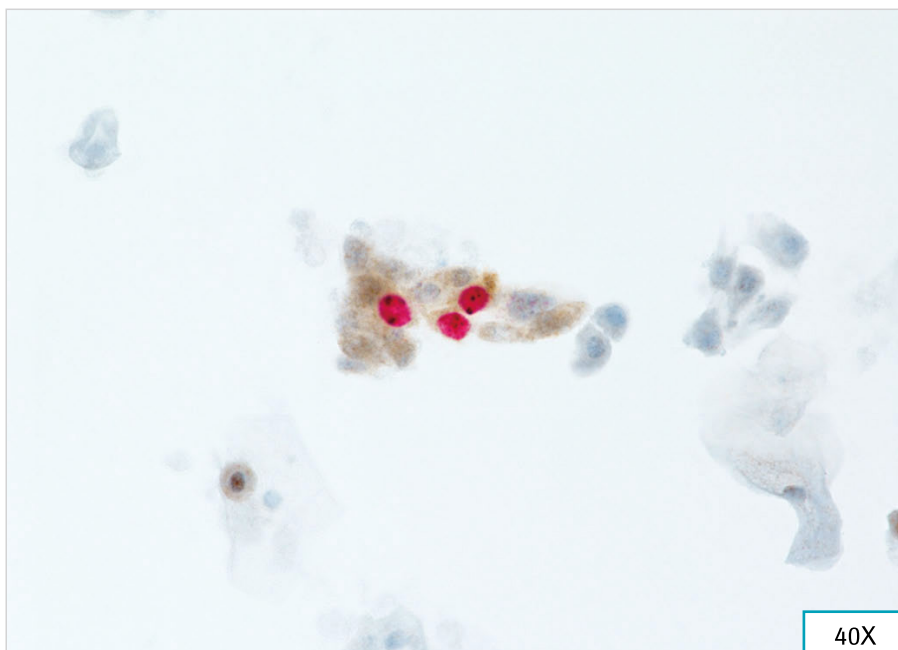
12. 核に特異的なKi-67の発現と、細胞質に極めて弱い茶色の発現が認められ、バックグラウンド染色は認められない1個の「疑わしい」細胞を認める。

臨床の場では、このような染色性が認められる細胞が1個のみである症例については、患者の病歴を踏まえコンセンサスレビューを行ったうえで、CINtec® PLUS Cytology陽性または陰性と判定することが推奨される。



13. 細胞質と核に弱い特異的なp16の発現が認められ、核に弱い特異的なKi-67の発現が認められる共発現した細胞(右上)を1個認め、CINtec® PLUS Cytology陽性である。他の細胞(左下)の細胞質や核にはp16の発現しか認められない。

細胞への共発現を確認するには、特異的な赤色の染色と茶色の染色を区別するために顕微鏡の視野を明るくする必要があることがある。コントロール細胞には非特異的な茶色のバックグラウンド染色が認められないため、共発現した細胞における弱い特異的なp16の発現が区別しやすい。



14. 集塊辺縁部に共発現した細胞を1個認める細胞集塊であり、CINtec® PLUS Cytology陽性である。

この細胞集塊では、3つの核に特異的なKi-67の発現が認められる。細胞集塊の辺縁部にある、画像内で一番下の核にKi-67の発現を認める細胞には、特異的な茶色の細胞質への染まりが認められる。

この細胞集塊には、弱いびまん性のp16の発現も認められる。



参考文献

1. Castle, P.E.P. et al., 2009. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstetrics and gynecology*, 113(1), pp.18–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694845&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 4, 2014].
2. Arends, M.J., Buckley, C.H. & Wells, M., 1998. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *Journal of clinical pathology*, 51(2), pp.96–103. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=500501&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
3. Muñoz, N. et al., 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, pp.S3/1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995> [Accessed May 23, 2014].
4. Killeen, J.L. et al., 2014. Improved abnormal pap smear triage using cervical cancer biomarkers. *Journal of lower genital tract disease*, 18(1), pp.1–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760145>.
5. Van Ballegooijen, M. et al., 1997. Present evidence on the value of HPV testing for cervical cancer screening: a model-based exploration of the (cost-) effectiveness. *British journal of cancer*, 76(5), pp.651–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2228006&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
6. Zappacosta, R. et al., 2013. Implementing specificity of HPV-DNA primary screening in a successful organised cervical cancer prevention programme. *Gynecologic oncology*, 128(3), pp.427–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200910> [Accessed May 27, 2014].
7. Franco, E.L. et al., 2009. The expected impact of HPV vaccination on the accuracy of cervical cancer screening: the need for a paradigm change. *Archives of medical research*, 40(6), pp.478–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853188> [Accessed June 3, 2014].
8. Naucler, P. et al., 2009. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(2), pp.88–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141778> [Accessed June 3, 2014].
9. Chelmwow, D. et al., 2012. The evolution of cervical screening and the specialty of obstetrics and gynecology. *Obstetrics and gynecology*, 119(4), pp.695–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433332> [Accessed June 3, 2014].
10. Wentzensen, N. & von Knebel Doeberitz, M., 2007. Biomarkers in cervical cancer screening. *Disease markers*, 23(4), pp.315–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3317214&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
11. Arbyn, M. et al., 2013. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC- US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 132(1), pp.101–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610699> [Accessed June 2, 2014].

12. Roelens, J. et al., 2012. p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer cytopathology*, 120(5), pp.294–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700382> [Accessed May 27, 2014].
13. Carozzi, F. et al., 2013. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *The lancet oncology*, 14(2), pp.168–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261355> [Accessed May 29, 2014].
14. Schmidt, D. et al., 2011. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer cytopathology*, 119(3), pp.158–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442767> [Accessed May 19, 2014].
15. Petry, K.U. et al., 2011. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecologic oncology*, 121(3), pp.505–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420158> [Accessed May 19, 2014].
16. Ravarino, A. et al., 2012. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. *American journal of clinical pathology*, 138(5), pp.652–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086765> [Accessed June 3, 2014].
17. Singh, M. et al., 2012. Immunocytochemical colocalization of P16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. *Cancer cytopathology*, 120(1), pp.26–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162342> [Accessed May 27, 2014].
18. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R; PALMS Study Group. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Oct 16;105(20):1550–7.
19. Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000), The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.*, 182: 311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
20. Roche, 2014d. Module 3: Cervical Cancer Screening and Diagnosis Methods. , p.1091.
21. Waldstrøm, M., 2014. The Value of Adding CINtec PLUS Dual-Staining for p16 (INK4A)/ Ki-67 on COBAS HPV Positive Women for Detection of High Grade CIN
22. Bethesda system: Terminology for reporting results of cervical cytology, 2014



ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

〒108-0075 東京都港区 港南1-2-70

<http://www.roche-diagnostics.jp>

カスタマーソリューションセンター ☎ **0120-600-152**

「VENTANA」は、ロシュ社の登録商標です。