

がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

第2版

(2024年11月22日改訂)



公益社団法人

日本臨床細胞学会

The Japanese Society of Clinical Cytology

がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

— 作成担当 —

公益社団法人 日本臨床細胞学会
ゲノム診療時代における細胞診のあり方検討ワーキンググループ

委員長

森井 英一 (大阪大学大学院 医学系研究科 病態病理学)

委員

畑中 豊 (北海道大学病院 先端診断技術開発センター)

元井 紀子 (埼玉県立がんセンター 病理診断科)

河原 明彦 (久留米大学病院 病理診断科・病理部)

濱川 真治 (公立昭和病院 臨床検査科)

桑田 健 (国立がん研究センター東病院 遺伝子診療部門)

長友 忠相 (大阪大学医学部附属病院 病理部)

小田 義直 (九州大学大学院 医学研究院 形態機能病理学)

岡本 愛光 (東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)

田中 良太 (杏林大学医学部 呼吸器・甲状腺外科学)

伊豫田 明 (東邦大学医学部 外科学講座 呼吸器外科学分野)

前田 一郎 (北里大学北里研究所病院 病理診断科)

佐藤 之俊 (北里大学医学部 呼吸器外科学)

協力委員

松尾 由紀子 (北里大学医学部 呼吸器外科学)

中村 信之 (国立がん研究センター東病院 臨床検査部)

山口 知彦 (九州大学病院 病理診断科・病理部)

竹中 将貴 (東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)

川畑 絢子 (東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)

永田 真莉乃 (埼玉県立がんセンター 病理診断科)

安倍 秀幸 (久留米大学病院 病理診断科・病理部)

畑中 佳奈子 (北海道大学病院 先端診断技術開発センター)

奥村 麻美 (北海道大学病院 先端診断技術開発センター)

※実証データ担当者および協力者は「細胞診材料の取扱いに関する実証データ」の項に記載

目 次

「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針」発刊にあたり	3
1. ゲノム診療における細胞検体利用への期待	7
2. 細胞検体の適切な取扱い	9
2.1 検体処理前の取扱い	11
2.2 液状化検体細胞診（LBC）検体	14
2.2.1 LBC 検体作製	14
2.2.2 腫瘍細胞含有割合の評価	14
2.2.3 核酸抽出法	14
2.2.4 その他留意点	15
2.3 ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）セルブロック検体	19
2.3.1 セルブロック作製	19
2.3.2 腫瘍細胞含有割合の評価	19
2.3.3 核酸抽出法	20
2.3.4 その他留意点	20
2.4 塗抹標本	23
2.4.1 既染標本の取扱い	23
2.4.2 未染標本の取扱い	23
3. 参考文献	25
4. 参考資料	29

補 遺

S1. 細胞診材料の取扱いに関する実証データ	
S1.1 第1版実証データ	
S1.2 第2版実証データ	
S2. 調査資料	

略語表

FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded	ホルマリン固定パラフィン包埋
IVD	<i>in vitro</i> diagnostics	体外診断用医薬品
LBC	liquid-based cytology	液状化検体細胞診
LDT	laboratory-developed test	薬事未承認検査
NBF	neutral-buffered formalin	中性緩衝ホルマリン（液）
NGS	next-generation sequencing	次世代シーケンス法

「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針（第2版）」改訂にあたり

がんの分子標的療法の導入以来、がん細胞の遺伝子変異を症例ごとに調べ、変異に有効な薬剤を検討する個別化医療が行われるようになった。本邦では、2019年6月に複数の遺伝子変異を一括して調べる遺伝子パネル検査が保険適用となり、検査結果を協議するエキスパートパネルの開催も日常のものとなり、がんゲノム医療が完全に実装化された状況にある。その中で、公益社団法人日本臨床細胞学会(以下、本学会)は、がんゲノム診断での使用に耐えうる細胞診検体に関する『がんゲノム診療時代における細胞診検体の取扱い指針（初版）』（以下、取扱い指針初版）を2021年6月に発刊した。この内容はGuidelines for Handling of Cytological Specimens in Cancer Genomic Medicineとして2023年にPathobiology誌に公表され、国際的にも注目されている。取扱い指針初版を発刊後、細胞診検体を用いることのできる遺伝子パネル検査も実装化され、ますますがんゲノム医療における細胞診検体の重要性が増しているといえよう。

取扱い指針初版では、アルコールを主体として固定されることの多い細胞診検体の核酸品質が良好であることに着目し、がんゲノム医療における核酸ソースとしての細胞診検体の取扱い上の注意点について、主に細胞株検体を用いた実証実験の結果をもとに解説された。取扱い指針初版に掲載された実証実験以外にも、臨床検体を用いた実験や次世代シーケンサーを用いた実験が並行して行われており、今回、それらの結果がある程度得られた。そのため、これらの結果も含めて取扱い指針第二版を取りまとめることとなった。これらの実証実験は多数の施設の参加のもと行われており、まだまだ検討中のものも多い。今後も整理できたものを日本臨床細胞学会のホームページ上で会員の皆様との情報共有を目的に随時追加公開していこうと考えている。これらの実証実験の結果が、新たな手法や問題解決の方法の発展につながることを祈念する。

最後に、がんゲノム診療時代における細胞診の重要性に注目され、がんゲノム診療時代における細胞診のあり方検討ワーキンググループと、その中のゲノム時代における呼吸器細胞診検体処理の精度管理ワーキンググループの立ち上げを決断された、青木大輔元理事長に深謝申し上げる。

令和6年11月22日

公益社団法人 日本臨床細胞学会

理事長 岡本 愛光

がんゲノム診療時代における細胞診のあり方検討

ワーキンググループ委員長 森井 英一

ゲノム時代における呼吸器細胞診検体処理の精度管理

ワーキンググループ委員長 佐藤 之俊

「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針（初版）」 発刊にあたり

がんの薬物療法は急速に発展している。分子標的療法の導入以来、がん細胞の遺伝子変異を症例ごとに調べ、変異に有効な薬剤がないか検討する個別化医療が行われるようになってきている。本邦では、2019年6月に複数の遺伝子変異を一括して調べる遺伝子パネル検査が保険適用となり、検査結果を協議するエキスパートパネルの開催も日常のものとなり、がんゲノム医療が完全に実装化されたと言えよう。そこで、公益社団法人日本臨床細胞学会(以下、本学会)では、がんゲノム診断での使用に耐えうる細胞診検体に関する『がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針』(以下、取扱指針)を発刊することとした。

現在のがんゲノム医療における核酸のソースとなる検体としては、あくまでも組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋した検体が想定されている。しかし、遺伝子パネル検査の経験値があがってきた現状では、ホルマリン固定パラフィン包埋検体の保管期間があまりにも長いものや、適切な固定ができていない検体では芳しい結果を得ることが難しいと感じることが多い。がんゲノム医療が実装化された現在で病理検体に求められる条件は、形態的な判断のみならず、分子レベルの判断、つまり遺伝子変異の判定が可能な検体ということであり、細胞診検体にも当てはまる。組織のパラフィン包埋検体と比較して細胞診検体は、アルコールを主体とした固定を行った場合などでは、核酸の品質保持に有利な検体と言える。このことから、細胞診検体は遺伝子パネル検査における有望な核酸ソースとなりうる。しかし、適切な固定液、固定時間を守るといった pre-analytical な段階での注意などは当然必要である。

このような背景から、本学会では、青木大輔前理事長の英断により、がんゲノム診療時代における細胞診のあり方検討ワーキンググループと、その中のゲノム時代における呼吸器細胞診検体処理の精度管理ワーキンググループが立ち上げられた。これらのワーキンググループでは、まずがんゲノム医療時代を念頭においた細胞検体の使用状況についてアンケート調査を行い、次のがんゲノム診療に用いるために細胞診検体で注意すべき点を洗い出すことを目的とした実証実験を多数の施設の参加のもと行っている。まだ検討中の事項も多いが、ある程度の結果が出たものについては、臨床細胞学会のホームページ上で会員の皆

様との情報共有を目的に公開していこうと考えている。用いる手法によってはがんゲノム医療の目的に現時点では十分応えることのできないこともあるが、問題のある点を明らかにし、それを解決していく過程の一つとして捉え、これらの実証実験の結果をもとに、新たな手法や問題解決の方法の発展につながることを祈念する。

令和3年6月6日

公益社団法人 日本臨床細胞学会

理事長 佐藤 之俊
がんゲノム診療時代における細胞診のあり方検討
ワーキンググループ委員長 森井 英一

ゲノム診療時代における細胞診のあり方検討ワーキンググループ 第1版 委員/協力委員

[委員] 第2版と同じ。[協力委員] 松尾由紀子(北里大学), 中村信之(国立がん研究センター東病院), 中井登紀子(国立がん研究センター東病院), 福原萌(国立がん研究センター中央病院), 時田和也(国立がん研究センター中央病院), 山口知彦(九州大学), 竹中将貴(東京慈恵会医科大学), 川端絢子(東京慈恵会医科大学) ※所属は当時

1. ゲノム診療における細胞検体利用への期待

次世代シーケンサー（NGS）を用いたがん遺伝子パネル検査が2019年6月より保険適用から5年が経過した。この間、様々な診療上の課題に直面したが、なかでも検査に用いる組織・細胞検体に関する課題、そしてその解決への取り組みは、医療機関の病理部門にとって極めて重要となっている。がん遺伝子パネル検査において最も多く用いられているホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織検体については、検体処理方法やFFPEブロックの保管状況等によってその品質が左右され、NGS検査において、使用不適や解析不能となる場合が少なくない^{文献1}。こうした背景を受け、細胞検体使用への期待が高まるなか、当学会では取扱い指針初版を2021年6月に発出した。

遺伝子関連検査における細胞検体のこれまでの使用状況は、病原体遺伝子検査（核酸検査）では、婦人科検体を用いたヒトパピローマウイルス（HPV）検査で最も進んでおり、これに使用する検査システムの多くは、すでに体外診断用医薬品（IVD）承認、保険適用されている。体細胞遺伝子検査では、泌尿器検体（尿中細胞）を用いた膀胱癌の再発の診断補助のためのFISH検査が、IVD承認・保険適用されている。一方、呼吸器検体を対象とした肺癌コンパニオン診断（CDx）では、これまでEGFR変異検査等のPCRベースの単一遺伝子検査の一部で使用されてきたほか、近年、細胞検体に適した分析性能を有するNGS検査システムが、取扱い指針初版発出後の2023年1月に臨床導入され、徐々に細胞検体を用いたNGS検査が増加している。また組織検体を用いた包括的がんゲノムプロファイリング（CGP）検査では、FFPE組織検体での検査実施が難しい場合に、その代替として細胞検体であるFFPEセルブロック検体が利用されている。さらに海外では塗抹標本や液状化検体細胞診（LBC）標本などの利用やそれに向けた検討も進んでいる^{文献2-6}。がんゲノム診療において、組織検体と細胞検体は相互補完的であり、それぞれの特性を整理・把握しておくことが重要である（表1）。

現在、国内における細胞検体の検体処理は、各施設において様々な工夫・改良がなされている一方、複数の変法が存在している状況にある。また体細胞遺伝子検査では、前述のようにEGFR変異検査などの肺癌コンパニオン診断において細胞検体が比較的用いられているが、これまでの単一遺伝子検査では、細胞検体に占める腫瘍細胞含有割合についてはあまり意識されず検査がなされていた。NGSを用いた遺伝子パネル検査では、分析性能に対応した腫瘍細胞含有割合が必要となっており、この評価・判定は重要なプロセスとなっ

ている。現在のがん遺伝子パネル検査（CDx および CGP 検査）は治療選択を主目的としたものであり、検体処理の施設間差による核酸品質のばらつきや不適正検体での検査実施は、誤った検査結果の発生による患者の治療機会の損失につながり、大きな不利益を被ることとなることから、より厳格な検体取扱いが求められている。今後細胞検体の利用拡大が予想されることから、医療機関が担う検査のプレアナリシス段階およびアナリシス段階の標準化となお一層の精度管理が重要となっている。

表1 組織検体と細胞検体の特性比較

検体採取法	組織検体		細胞検体				
	手術切除 内視鏡的切除	生検採取 穿刺吸引等	穿刺吸引・擦過等		体腔液・洗浄液等		
			塗抹法	LBC法	塗抹法	LBC法	セルブロック法
腫瘍細胞量	多	少	極少～少	極少～少	様々	様々	様々
検体処理	ホルマリン固定 パラフィン包埋	ホルマリン固定 パラフィン包埋	主に95% エタノール	18-67% エタノール/ メタノール	主に95% エタノール	18-67% エタノール/ メタノール	ホルマリン固定 パラフィン包埋
核酸品質	悪い場合あり	比較的良い	かなり良い	かなり良い	かなり良い	かなり良い	比較的良い
腫瘍細胞含有 割合の確認	易	易	難しい症例 がある	易	難しい症例 がある	易	易
遺伝子パネル の適用性	様々なパネルに 対応可	大型パネルを用 いた NGS 検査が 不可な場合あり	腫瘍細胞量が極少の場合は NGS 検査が不可な場合あり		腫瘍細胞量が極少の場合は NGS 検査が不可な場合あり		大型パネルを用い た NGS 検査が 不可な場合あり

2. 細胞検体の適切な取扱い

本指針では、細胞診断領域におけるがんゲノム診療の臨床導入への速やかな対応をとるため、今後の細胞検体の利用普及に向け、診療を専らとする一般医療機関において要求される細胞検体の適切かつ標準的な取扱い方法を以下に定める。細胞検体処理は、多種多様な方法が現在用いられているが、本指針では、とりわけがん遺伝子パネル検査などゲノム診療で利用が期待される細胞検体の処理・作製法^{文献6}や、腫瘍細胞含有割合評価に基づく検査適性の判定法等に焦点を絞り解説することとした（図参照）。

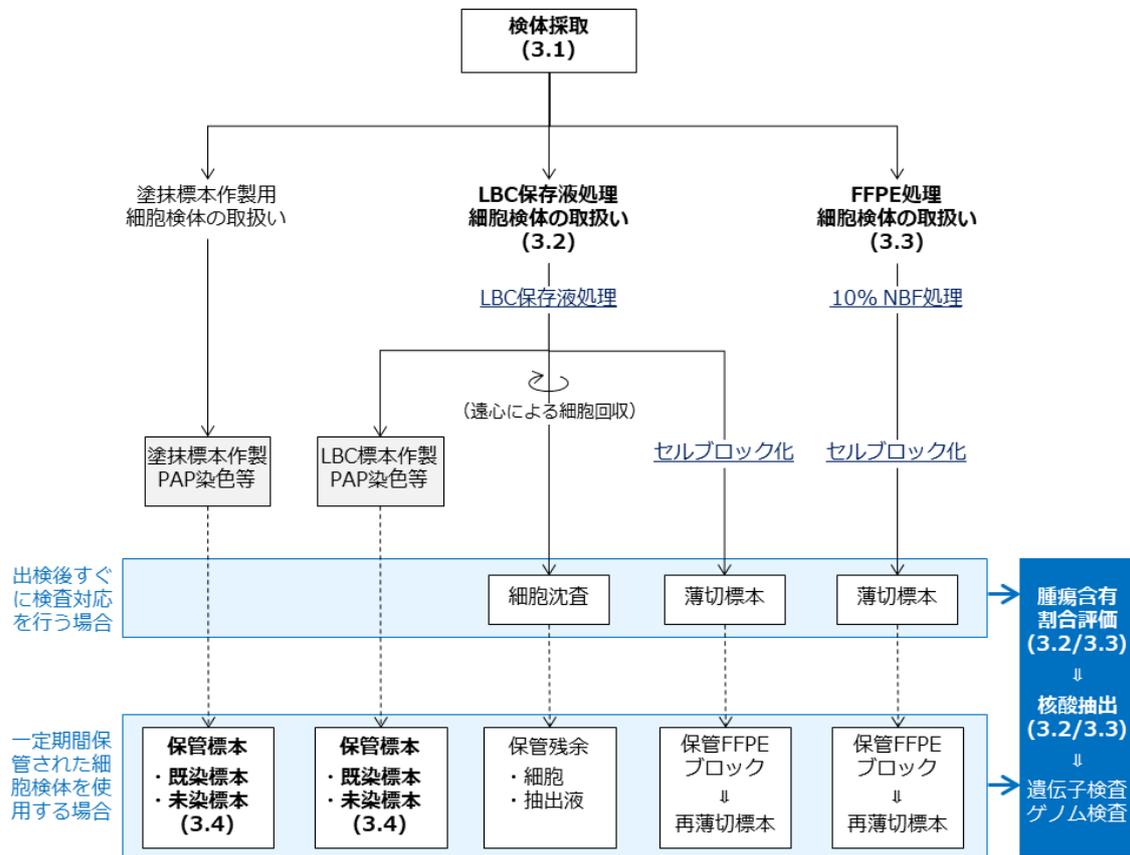


図 ゲノム診療で用いることが想定される主な細胞検体/標本種

()内の番号は本章の推奨記載項目に対応

本指針は、後述の実証データや文献情報等に基づき、以下の凡例に従い推奨するものであり、「診療ガイドライン」等に見るようなEBMに基づいた推奨グレードは挙げていない。推奨については、日常診療におけるベストプラクティスとして推奨される事項（clinical recommendation; C）と、ゲノムスクリーニング（網羅性の高いゲノム解析）に基づいた介入研究や保険診療外のゲノム診断等への利用が考慮される場合に推奨される事項（research recommendation; R）に区分した。なお本推奨は今後のゲノム診断状況を踏まえ、適時改訂・更新が必要であると考え。

凡 例

- (C)： 日常診療において推奨される事項
- (R)： 臨床研究等への利用を考慮する場合に推奨される事項
- (N)： 回避すべき事項

2.1 検体処理前の取扱い

《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する (C) 実証データ①
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保管し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい (C) 実証データ①
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかに LBC 保存液で処理する (C) 実証データ①
4. LBC 保存液に浮遊させた細胞検体の場合，常温ないし冷蔵（4℃）で保管し，速やかに核酸抽出を行うことが望ましい (C) ※「3.2 LBC 検体」および実証データ④⑤⑥参照
5. 凍結する場合は，液体窒素やドライアイスアセトン法などで急速に凍結し，マイナス 180℃ないしマイナス 80℃にて保管し，速やかに核酸抽出することが望ましい (R) 文献 7
6. 未処理の細胞検体を室温で放置することは極力回避する (N) 実証データ①
7. LBC 保存液に浮遊させた細胞検体の保管は，直射日光を避け，高温，多湿環境を回避する (N)
8. 凍結検体の場合は，融解・凍結の繰り返しは回避する (N) 文献 7

《その他の注意点》

9. 細胞検体のコンタミネーションを回避するために，作業環境を整える (C) 文献 7
10. 複数の腫瘍や腫瘍内で異なる性状部位から採取する場合は，部位が同定できるように識別符号を付与する (C) 文献 7
11. 体腔液（胸水，腹水など），尿などの液状検体は，検体量と含まれる細胞量により適切な検体処理法を選択することが望ましい (C)
12. 形態学的に標的細胞の有無および変性の程度を確認することが望ましいが，検体量が少ない場合，細胞形態診断とゲノム診断のどちらを優先するかは，あらかじめ取り決めをしておくことが望ましい (C) 実証データ II-①, ②
13. 検体量と細胞量が十分な場合は，複数の保管方法を併用することを考慮してもよ

い (R) ※「3.2 LBC 検体」参照

14. 液状検体の核酸品質は採取法等により異なることを考慮する(C) 実証データII-③

[補足説明]

- ¹補 生理食塩水の浮遊細胞検体を用いた実証実験では、DNA 品質は保管時間が長くなると低下する傾向があり、可及的速やかな核酸抽出の開始が推奨される。検体処理まで時間がかかる場合は、室温ではなく冷蔵 (4°C) で保管することで品質低下を抑えることができる^{文献8}。
- ¹補 細胞検体での保管時間、温度が核酸品質に及ぼす影響に関する検証実験の結果は病理組織検体を用いた実証実験と同様の傾向であり、細胞検体も組織検体に準じた迅速な検体処理が推奨される^{文献7}。
- ⁴補 冷蔵や冷凍保管は、酵素や微生物による分解や腐敗の抑制効果があるとして古くから知られている。ホルマリンを含む LBC 保存液を用いた残検体は、速やかに追加処理することができなければ、冷蔵で一時的に保管し DNA の断片化のリスクを低減することが推奨される (C) ^{文献8}。また、採取後直ちに冷凍保管後、ないし LBC 処理後凍結保管後の検体を用いて遺伝子検査を行うことも可能である^{文献9, 実証データII-④}。超低温下での長期保管した未処理細胞検体および LBC 保存液処理後の細胞検体の核酸品質に関して、少なくとも6か月から2年程度の保管においては、一定の DNA および RNA 収量・品質が得られることが示されている^{実証データ⑥参照, 実証データII-④①}。細胞検体を LBC 保存液で処理後、2週間以内に細胞をペレットとし、マイナス 80°C で凍結保管後、この凍結ペレットから核酸抽出しゲノム検査を行うことも可能である^{実証データII-⑤}。ただし、検査に必要な核酸量や品質はゲノム検査により異なるため、注意を要する。
- ¹²補 目的とする検査法が単一遺伝子検査か遺伝子パネル検査かにより、求められる検体の品質基準が異なるため、目的に応じて適切な方法を選択する。例えば、パネル検査の場合、腫瘍細胞含有割合が基準の一つとなるため、その評価ができる方法を選択する。単一遺伝子検査の場合、例えば既知の *EGFR* 等変異陽性がんの場合、髄液や胸水検体で腫瘍細胞が確認できない場合でも遺伝子検査が診療方針決定に有用な場合があり、臨床医と病理検査室・遺伝子検査室が連携して検査方法を選択することが望ましい。
- ¹³補 LBC 保存液には、組成の異なる複数の試薬が存在するが、がんゲノム検査を目的とした検体処理方法は現時点では確立されていない。よって、検体が十分採取できた場合

には、複数の保管方法を併用することも考慮される(R) ※「3.2 LBC 検体」参照

13 補 保存試薬の種類，核酸抽出方法はいまだ標準化の過程であり，最適な方法が確立されていないことから，複数の方法を併用してもよいが，労力，手間がかかり，また保管場所も必要となるため，実施できる施設は限られる。

14 補 採取法別による体腔液検体の DNA 品質は概ね安定しているため，遺伝子検査へ提出する際には腫瘍含有率を考慮するとよい。検体によっては RNA 品質の低下を示すことがあるので，可能な限り新鮮な体腔液検体を遺伝子検査に提出することが望ましい
実証データ II - ③

2.2 液状化検体細胞診（LBC）検体

2.2.1 LBC 検体作製

《各 LBC 標本について》

1. ゲノム解析に必要な数の有核細胞の回収を行う (C) ^{文献7}
2. 採取された細胞は速やかに LBC 保存液で浮遊固定する (C)
3. 固定時間に関しては各社 LBC の取扱いに従う (C)
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい (C)

2.2.2 腫瘍細胞含有割合の評価

5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する (C) ^{実証データ②}

2.2.3 核酸抽出法

《ホルマリンを含む LBC 保存検体における核酸抽出》

6. 市販の FFPE 組織用 DNA 抽出キットを用いて LBC 保存液から DNA を抽出する場合、プロテイナーゼ K 溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する (C) ^{実証データ③, 文献10}
7. 市販の FFPE 組織用 DNA 抽出キットを用いて LBC 保存液から DNA を抽出する場合、長時間の加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は核酸の質の低下につながるため、適切な条件で実施する (R) ^{実証データ③}

《ホルマリンを含まない LBC 保存検体における核酸抽出》

8. 市販の FFPE 組織用 DNA 抽出キットを用いて LBC 保存液から DNA を抽出する場合、プロテイナーゼ K 溶液によるタンパク質の溶解は、キット手順書より短時間で行うことができる (R) ^{実証データ③}
9. 市販の FFPE 組織用 DNA 抽出キットを用いて LBC 保存液から DNA を抽出する場合、加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去を省略することができる (R) ^{実証データ③}

2.2.4 核酸の収量と品質

10. ホルマリンを含まない LBC 保存液で処理された検体から RNA を抽出する場合は細胞用の RNA 抽出キットを用いることが推奨される (C) 実証データ II-⑥
11. ホルマリンを含む LBC 保存液で処理された検体や FFPE 用の RNA 抽出キットは検査に適した RNA を得られない可能性がある (R) 実証データ II-⑥
12. 保存液の種類と抽出キットの組み合わせだけでなく、検体の性状や量も核酸の収量や品質に影響を及ぼす可能性がある (R) 実証データ⑥, 実証データ II-④, ⑤, ⑥

2.2.5 LBC 保管方法

《ホルマリンを含む LBC 保存検体における保管》

13. 臨床検体で 6 ヶ月以上の長期保管が見込まれる場合、核酸収量の保持が必要な際はセルブロック、もしくはマイナス 80°Cでの保管が望ましい (R) 実証データ II-⑦, ⑧, ⑨, ⑩, 文献 11
14. 臨床検体で 6 ヶ月以上の長期保管が見込まれる場合、DNA 品質の保持が必要な際はマイナス 80°Cでの保管が望ましい (R) 実証データ II-⑦, ⑧, ⑨, ⑩, 文献 11
15. セルブロック作成でパラフィン包埋をする際の温度上昇は、ヌクレアーゼ活性などの影響により核酸が断片化するため、室温での作業時間の長さや温度上昇には注意が必要である (N) 実証データ II-⑦, ⑧, 文献 11
16. 手術切除検体からの擦過材料では、冷虚血時間の影響が大きいため、検体摘出後は速やかに冷蔵 (4°C) で保管し、可及的速やかに材料を固定する (R) 実証データ II-⑦, ⑧, 文献 11

《ホルマリンを含まない LBC 保存検体における保管》

17. 臨床検体で DNA 品質の保持において 12 ヶ月程度以内であれば室温保管で比較的安定しているが、長期保管が見込まれる場合は、冷蔵 (4°C) での保管が望ましい (R)

18. 臨床検体で RNA 品質の保持には冷蔵 (4°C) での保管が望ましい (R) 実証データII-⑩

2.2.6 その他留意点

19. 概ね 6 か月以上長期保管した LBC 検体をゲノム検査に用いることは極力回避する (N)

[補足説明]

- ¹補 ゲノム解析に必要な十分な数の有核細胞数を回収し、腫瘍細胞の分布や比率の評価には従来法の塗抹標本作製との併用が推奨される (C).
- ¹補 生検時にえられた残余検体を LBC で固定した場合、概ね 6 ヶ月ほど経過した検体からでも単一遺伝子検査が可能のため、採取後は速やかに固定し冷蔵 (4°C) で保管することが望まれる (C) 文献13
- ²補 LBC 固定材料からのセルブロック作成は選択肢の一つで、各種コンパニオン診断を想定した遺伝子解析が可能である (R) 文献14
- ²補 細胞量過少、不適切な細胞採取部位、溶血法や固定法の相違による細胞の変性を極力回避する (N).
- ²⁻³補 各社の LBC によって得られる細胞形態は異なるため、LBC 標本の細胞形態に慣れておくことが求められる (R) 実証データ④⑤⑦.
- ³補 メタノールやエタノールを主剤とする LBC 保存液はメタノール/エタノール系保存液と呼ばれ、一方、微量のホルマリンを含有している LBC 固定液はホルマリン系固定液と呼ばれている。LBC 保存液は種類によって核酸品質への影響が異なる 実証データ⑧~⑬。各社の LBC 保存液は、製品によって組成や溶血作用が異なっているが、LBC 保存液からのセルブロック作製は可能である 実証データ⑦, 文献15, 14 ※「6. 補遺 (補表3および4)」参照
- ⁴⁻⁵補 腫瘍細胞の分布評価にはパパニコロウ染色を基本とするが、追加で免疫細胞化学染色や特殊染色による評価が推奨される (C).
- ⁶補 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [キアゲン社]のキット手順書には「56°Cで1時間ある

いはサンプルが完全に溶解するまで」と記載がある。サンプルが完全に溶解していれば、56°Cで30分でも収量・品質を確保できる (R)^{実証データ③}, 文献 10, 16。また、この手順を省略すると収量・品質が著しく低下する (N)^{実証データ③}。

6補 Maxwell FFPE Plus DNA Kit [プロメガ社] のキット手順書には「70°Cで1時間～overnight インキュベートする」と記載がある。LBC 保存検体を用いる場合、この時間は1時間～4時間で十分である (R)^{実証データ③}。Overnight による収量と品質への影響は未検証である。また、この手順を省略すると収量・品質が著しく低下する (N)^{実証データ③}。

6-7補 ホルマリンを含む LBC 保存液とは、具体的に CytoRich Red 保存液 (BD 社) 等を想定している。

7補 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [キアゲン社] のキット手順書には「90°Cで1時間インキュベートする」ように記載がある。LBC 保存検体を用いる場合、この時間を10分に短縮することで、より収量・品質の向上が期待できる (R)^{実証データ③}。この手順を省略すると収量と品質が低下する可能性がある (N)^{実証データ③}, 文献 17, 18。

8補 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [キアゲン社] のキット手順書には「56°Cで1時間あるいはサンプルが完全に溶解するまで」と記載がある。サンプルが完全に溶解していれば、56°Cで30分でも収量・品質を確保できる (R)。また、この手順を省略することも場合によっては可能であるが、蛋白分解酵素の本来の役割を考慮すれば省略しないほうがよい^{実証データ③}。

8補 Maxwell FFPE Plus DNA Kit [プロメガ社] のキット手順書には「70°Cで1時間～overnight インキュベートする」と記載がある。LBC 保存検体を用いる場合、この時間は30分で十分である (R)。この時間を4時間まで延長しても収量と品質に影響がないと考えられる (R)^{実証データ③}。Overnight による収量と品質への影響は未検証である。また、この操作を省略することも場合によっては可能であるが、蛋白分解酵素の本来の役割を考慮すれば省略しないほうがよい。

8-9補 ホルマリンを含まない LBC 保存液とは、具体的に CytoRich Blue 保存液 (BD 社), ThinPrep PreservCyt 液 (ホロジック社), Cellprep バイアル (ロシュ社) 等を想定している。

9補 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [キアゲン社] のキット手順書には「90°Cで1時間イン

キューベートする」ように記載があるが、この手順を省略することで、品質の向上が期待できる (R)^{実証データ③}。

¹⁰補 LBC 検体は適正な条件下での長期保管が可能であるが、ゲノム検査に用いる場合は長期保管検体を用いることは極力回避する (N)。

2.3 ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）セルブロック検体

2.3.1 セルブロック作製

《検体提出時および検体処理後の取扱い》

1. 適正な細胞量を回収し必要な前処理を適切に行ったのちに、可及的速やかにホルマリン固定液に浸透し固定を行うことが望ましい (C) 実証データ II-⑬, ⑭なお、溶血法は核酸品質に影響を及ぼすため極力回避する (C) 実証データ II-⑬, ⑭
2. 診断後に FFPE セルブロックを作製する場合、残検体は冷蔵（4°C）保管を行うことが望ましい (C) 文献 8

《ホルマリン固定液の組成》

3. ホルマリン固定液の組成は、10%中性緩衝ホルマリン（NBF）溶液であることが望ましい (C) 文献 7, 実証データ II-⑬, ⑭

《ホルマリン固定液における許容処理時間》

4. 細胞検体では、組織生検と同様に 6～24 時間程度の固定を行うことが望ましい (C) 文献 19, 実証データ II-⑬, ⑭
5. 遠心分離細胞収集法の遠心管法によるホルマリン重層固定では、多量の沈査検体を用いた場合、沈渣深層部が未固定になりやすいため固定不良（固定不足）による品質劣化を回避しなければならない (N)

《FFPE セルブロックの作製法の選択》

6. 遠心分離細胞収集法と細胞凝固法などさまざまな作製法が存在し、2 種類以上のセルブロック方法を準備しておくことが望ましい (C) 文献 15

《FFPE セルブロックのプロセッシング》

7. 固化しにくいセルブロックによるコンタミネーションの影響を極力回避する (N)

2.3.2 腫瘍細胞含有割合の評価

《セルブロック標本の腫瘍細胞含有割合評価》

8. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易なセルブロック作製法が望ましい

(C) 実証データ^⑭, 文献7, 文献19

9. ゲノム解析に必要な有核細胞回収と適正な固化を行う (C)
10. HE 染色やパパニコロウ染色, PAS 反応などにより腫瘍細胞を確認する (C)
11. 免疫細胞化学染色などの補助的検査を追加し腫瘍細胞を確認する (C)
12. サンプルングエラーや固定前処理による細胞の変性を極力回避する (N)
13. 室温にて1日以上保管した検体は極力回避する (N) 実証データ II -^⑬, ^⑭

2.3.3 核酸抽出法

《FFPE セルブロック検体における核酸抽出》

14. 市販の FFPE 組織用 DNA 抽出キットを用いる場合, キット手順書に従って行うことが望ましい(C) 実証データ^⑮
15. プロテイナーゼ K 溶液によるタンパク質の溶解と, 核酸とホルマリンのクロスリンクの除去を, 定温のインキュベーションで同時に行う市販の FFPE 組織用 DNA 抽出キットを用いる場合, 長時間のインキュベーションは核酸の質を低下させる可能性があり, 適切な条件で実施することが必要である (C) 実証データ^⑮

2.3.4 その他留意点

16. FFPE セルブロックの保管は, FFPE 組織と同様に室温でよいが, 高温多湿を避け冷暗所保管 (3 年未満) が望ましい (C) 文献7, 8, 実証データ II -^⑬, ^⑭

[補足説明]

¹補 LBC 保存液から 10%NBF 固定せずにセルブロックを作製している報告もあるが (R) 文献^{20, 21}, その FFPE ブロックの保管期間の影響などは未検証である。肺癌コンパニオン診断においては, 10%NBF 固定が必須であるため, 今後 LBC 保存液から作製した FFPE ブロックにおける核酸品質の検証が必要である。

²補 冷蔵や冷凍保管は, 酵素や微生物による分解や腐敗の抑制効果があるとして古くから知られている。細胞の残検体は, 速やかに追加処理することができなければ, 冷蔵で一時的に保管し DNA の断片化のリスクを低減することが推奨される (C) 文献8, 実証データ II -^⑬, ^⑭

- 3-4補 コンパニオン診断において、10%NBF 固定が推奨されている (C) ^{文献7}。がん細胞は10% NBF においても時間依存的に核酸品質に影響を受けるため、固定時間には注意が必要である ^{実証データ⑬, 実証データII-⑬, ⑭}。また、10%NBF による固定時間は、生検組織と同等あるいはそれより短い時間で固定が完了するので注意が必要である ^{文献22}。
- 5補 遠心管法による重層固定では細胞量を調整する必要がある。特に沈渣量が多い場合は、複数の試験管を準備し沈渣を適量分けてセルブロックを作製することが求められる。
- 6補 国内外においてさまざまな FFPE セルブロックの作製法が知られている ^{文献17}。国内において FFPE セルブロック作製法は大別して遠心分離細胞収集法（遠心管法やコロジオンバッグ法）と細胞固化法（寒天法やアルギン酸ナトリウム法）が使用されており、この中にそれぞれ複数の方法が存在する。いずれの手法においても長所や短所があり、すべての方法における核酸品質の十分な比較データは得られていない。ホルマリン液や LBC 保存液で混和固定された細胞は、検体量によっては固化しにくいことがあるため、2種類以上のセルブロック作製法を準備しておくことよい。（補遺1 および補遺2 参照）
- 7補 さまざまな細胞材料を使用するため、検体の状態によって固化することが困難な検体に遭遇することもある。FFPE セルブロックを作製する際は、密閉式自動固定包埋装置内のコンタミネーション（がん細胞の漏れ出し）に配慮する必要がある ^{文献25}。FFPE ブロックの薄切時には、他検体のコンタミネーションに十分注意する ^{文献7}。
- 8補 体腔液材料に関しては、遠心分離法による細胞沈渣に 10%NBF を重層し、垂直断面観察による細胞比重差を応用した腫瘍細胞の分布や比率の評価が推奨される ^{文献219}。
- 8-9補 細胞の固定法や溶血処理によってセルブロック内の細胞分布に変化を伴うことがあり、腫瘍細胞の分布や比率の評価には注意を要する (R)。
- 10補 腫瘍細胞の分布評価には HE 染色を基本とするが、パパニコロウ染色にて評価することも推奨される。また細胞質内の粘液の証明には PAS 反応やアルシアン青染色の評価が推奨される (C)。
- 11補 体腔液細胞材料の場合、活動性中皮細胞等との鑑別において、免疫細胞化学染色、FISH 法などによる中皮細胞マーカーや上皮細胞マーカー、腫瘍マーカーの補助的検査の追加評価が望ましい (C)。

- 12補 細胞量過少，不適切な細胞採取部位，溶血法や固定法の相違による細胞の変性を極力回避する(N).
- 13補 固定前に室温で1日以上保管した検体を用いたゲノム解析は極力回避する(N) 実証データ II-⑬, ⑭.
- 14補 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [キアゲン社]を用いる場合，加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は，90°Cで1時間インキュベートするようにキット手順書に記載があるが，FFPE セルブロック検体を用いる場合は90°Cのインキュベーションは30分まで短縮することが可能である(R) 実証データ⑮。また，この手順を省略すると収量・品質が低下する可能性がある(N) 実証データ⑮。
- 15補 Maxwell FFPE Plus DNA Kit [プロメガ社]を用いる場合，プロテイナーゼ K 溶液によるインキュベーションを，70°Cで4時間以上行くと品質が低下する可能性がある(R) 実証データ⑮。
- 16補 FFPE セルブロックの長期保管は，FFPE 組織と同様に核酸品質に影響を及ぼす 文献 21, 実証データ II-⑬, ⑭。そのため，可能な限り室温（25°C前後）の冷暗所による保管することが推奨される(C)。

2.4 塗抹標本

2.4.1 既染標本の取扱い

1. 既染細胞診標本を用いる遺伝子検査は、精度管理され、検査法に習熟した施設での実施が望ましい (R) ^{文献⁷}
2. 既染標本から細胞を回収する場合には、細胞の逸失、コンタミネーションに注意し、それを回避する (R)
3. 概ね6か月以上の長期間が経過した既染細胞診標本を用いるゲノム検査は極力回避する (N) ^{実証データ^⑩}
4. 既染標本を遺伝子検査に用いる場合は、細胞像をバーチャルスライドや顕微鏡写真などの形で保存することが望ましい (R)
5. 既染標本の固定法、染色法、封入の有無、保管法、核酸抽出までの時間などの記録が望ましい (R)

2.4.2 未染標本の取扱い

6. 未染細胞診標本を用いる遺伝子検査は、精度管理され、検査法に習熟した施設での実施が望ましい (R)
7. 未染標本に標的病変が含まれていることを確認することが望ましい (R)
8. 未染標本から細胞を回収する場合には、コンタミネーションに注意し、それを回避する (R)
9. 概ね6か月以上の長期間が経過した未染細胞診標本を用いるゲノム検査は極力回避する (N)
10. 未染標本の保管法、核酸抽出までの時間などの記録が望ましい (R)

[補足説明]

¹⁻⁵補 既染標本を用いる遺伝子検査は実施可能であるが、組織検体よりも解析不成功率が高い^{文献^{24, 25}}。検査に習熟した施設での実施が推奨される。また、結果の解釈には、偽陰性、偽陽性の可能性も考慮し、慎重に対応すべきである。また、長期保管検体では、

核酸品質の低下があるため、概ね 6 か月以上経過した検体ではパネル検査などには不向きである 実証データ^⑬。

4. 参考文献

- 1 Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 May;19(3):341-365.
- 2 Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, Routbort MJ, Aldape KD, Handal BA, Rahimi H, Reddy NG, Barkoh BA, Mishra BM, Paladugu AV, Manekia JH, Kalhor N, Chowdhuri SR, Staerke GA, Medeiros LJ, Luthra R, Patel KP. Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod Pathol.* 2014 Feb;27(2):314-27.
- 3 Balla A, Hampel KJ, Sharma MK, Cottrell CE, Sidiropoulos N. Comprehensive Validation of Cytology Specimens for Next-Generation Sequencing and Clinical Practice Experience. *J Mol Diagn.* 2018 Nov;20(6):812-821.
- 4 Roy-Chowdhuri S, Goswami RS, Chen H, Patel KP, Routbort MJ, Singh RR, Broaddus RR, Barkoh BA, Manekia J, Yao H, Medeiros LJ, Staerke G, Luthra R, Stewart J. Factors affecting the success of next-generation sequencing in cytology specimens. *Cancer Cytopathol.* 2015 Nov;123(11):659-68.
- 5 Roy-Chowdhuri S, Stewart J. Preanalytic Variables in Cytology: Lessons Learned From Next-Generation Sequencing-The MD Anderson Experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Nov;140(11):1191-1199.
- 6 Bellevicine C, Malapelle U, Vigliar E, Pisapia P, Vita G, Troncone G. How to prepare cytological samples for molecular testing. *J Clin Pathol.* 2017 Oct;70(10):819-826.
- 7 日本病理学会 (編). ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 (初版), 2019 年.
- 8 安倍 秀幸, 河原 明彦, 貞嶋 栄司, 村田 和也, 高瀬 頼妃呼, 牧野 諒央, 吉田 友子, 福満 千容, 篠田 由佳子, 内藤 嘉紀, 秋葉 純. サイトリッチレッドを用いた LBC 検

体の保存温度における核酸品質への影響. 日本臨床細胞学会雑誌. 2021 : 印刷中.

- 9 城戸 貴之, 白波瀬 浩幸, 平田 勝啓, 白井 孝夫, 古畑 彩子, 辻 眞里子, 南口 早智子, 三上 芳喜, 羽賀 博典, 中泉 明彦. *EGFR* 遺伝子変異解析用の細胞診検体保存における PreservCyt® Solution の有用性. 日本臨床細胞学会雑誌. 2013 ; 52 (5) : 411-14.
- 10 Matsuo Y, Yoshida T, Yamashita K, Satoh Y. Reducing DNA damage by formaldehyde in liquid-based cytology preservation solutions to enable the molecular testing of lung cancer specimens. *Cancer Cytopathol.* 2018 Dec;126(12):1011-1021.
- 11 Tanaka R, Fujiwara M, Nakazato Y, Arai N, Tachibana K, Sakamoto N, Kishimoto K, Kamma H, Shibahara J, Kondo H. Optimal Preservations of Cytological Materials Using Liquid-Based Cytology Fixatives for Next-Generation Sequencing Analysis. *Acta Cytol.* 2022 Apr;66(5):457-466.
- 12 Hoshino A, Oana Y, Ohi Y, Maeda Y, Omori M, Takada Y, Ikeda T, Sotome K, Maeda H, Yanagisawa T, Takeuchi O, Kuronuma S, Sangai T, Shibahara Y, Murakumo Y, Saegusa M, Kanomata N, Nagasawa S, Yamaguchi R, Yoshida M, Kozuka Y, Matsumoto H, Tsugawa K, Maeda I; Accuracy of Breast Fine-Needle Aspiration Cytology of the Japanese Society of Clinical Cytology. Using the DNA Integrity Number (DIN) to analyze DNA quality in specimens collected from liquid-based cytology after fine needle aspiration of breast tumors and lesions. *Acta Cytol.* 2024 Mar 29;68(2):145-152.
- 13 Tanaka R, Ohtsuka K, Ogura W, Arai N, Yoshida T, Nakazato Y, Tachibana K, Takata S, Fujiwara M, Kamma H, Shibahara J, Kondo H. Subtyping and EGFR mutation testing from blocks of cytological materials, based on liquid-based cytology for lung cancer at bronchoscopic examinations. *Diagn Cytopathol.* 2020 Jun;48(6):516-523.
- 14 Tanaka R, Sakamoto N, Suzuki H, Tachibana K, Ohtsuka K, Kishimoto K, Fujiwara M, Kamma H, Shibahara J, Kondo H. Genotyping and cytomorphological subtyping of lung adenocarcinoma based on liquid-based cytology. *Diagn Cytopathol.* 2019 Jun;47(6):564-570.

- 15 Nambirajan A, Jain D. Cell blocks in cytopathology: An update. *Cytopathology*. 2018;29:505-524.
- 16 Satoh Y, Matsuo Y, Kuba T, Yamashita K, Sawano M, Tozaka S, Yamazaki H, Sonoda D, Mikubo M, Naito M, Matsui Y, Shiomi K, Yoshida T, Murakumo Y. *EGFR* mutation genotyping and ALK status determination in liquid-based cytology samples of non-small cell lung cancer. *Virchows Arch*. 2020 May;476(5):753-762.
- 17 Dejmek A, Zendehtrokh N, Tomaszewska M, Edsjö A. Preparation of DNA from cytological material: effects of fixation, staining, and mounting medium on DNA yield and quality. *Cancer Cytopathol*. 2013 Jul;121(7):344-53.
- 18 Nishikawa T, Fujii T, Tatsumi S, Sugimoto A, Sekita-Hatakeyama Y, Shimada K, Yamazaki M, Hatakeyama K, Ohbayashi C. Molecular Analysis of Liquid-Based Cytological Specimen Using Virtually Positive Sputum with Adenocarcinoma Cells. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Feb 5;10(2):84.
- 19 濱川真治 近藤洋一 倉品賢治 小坂美絵 若林 良 柏崎好美 櫻井 勉 田頭 周吉本多一郎 亀井敏昭 瀧本雅文 矢持滋子 試験管法を用いたセルブロックにおける垂直断面（VSS）観察と水平断面（HCS）の腫瘍細胞分布と細胞量 日本臨床細胞学会誌 2022;61(5):314 - 320.
- 20 村田 和也, 河原 明彦, 安倍 秀幸, 高瀬 頼妃呼, 吉田 友子, 福満 千容, 篠田 由佳子, 牧野 諒央, 内藤 嘉紀, 秋葉 純. アルギン酸ナトリウム FFPE セルブロック法における核酸品質と蛋白発現-ホルマリン固定プロセスの違い. 日本臨床細胞学会雑誌. 2021;60(1):15-21
- 21 van Hemel BM, Suurmeijer AJ. Effective application of the methanol-based PreservCyt™ fixative and the Cellient™ automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry, and molecular biology. *Diagn Cytopathol*. 2013 Aug;41(8):734-41.
- 22 安倍 秀幸, 河原 明彦, 貞嶋栄司, 田中良太, 村田 和也, 高瀬 頼妃呼, 牧野 諒央, 吉田 友子, 福満 千容, 篠田 由佳子, 内藤 嘉紀, 秋葉 純. 液状化検体細胞診を用いたセルブロック法の核酸品質の解析と保管への影響. 日本臨床細胞学会雑誌.

2021;60:102-109.

- 23 坂牧 久仁子, 川井 健司, 河村 淳平, 島方 崇明, 林 友理恵, 篠 友希, 後藤 芳章, 鴨志田 伸吾, 桑尾 定仁. ティッシュペーパーを使用した迅速・簡便な集細胞法 (セルブロット法) とその応用に関する基礎的研究. 日本臨床細胞学会雑誌. 2020;59:83-91.
- 24 Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, Colasacco C, Dacic S, Hirsch FR, Kerr K, Kwiatkowski DJ, Ladanyi M, Nowak JA, Sholl L, Temple-Smolkin R, Solomon B, Souter LH, Thunnissen E, Tsao MS, Ventura CB, Wynes MW, Yatabe Y. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018 Mar;13(3):323-358.
- 25 Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II, Chen H, Fujimoto J, Kugler K, Franklin WA, Iafrate AJ, Ladanyi M, Kris MG, Johnson BE, Bunn PA, Minna JD, Kwiatkowski DJ; LCMC Investigators. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol*. 2015 May;10(5):768-777.
- 26 Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G, Lawlor RT, Scarpa A. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS One*. 2013 Jun 6;8(6):e62692.
- 27 Matsuo Y, Yamashita K, Yoshida T, Satoh Y. Method for preservation of DNA stability of liquid-based cytology specimens from a lung adenocarcinoma cell line. *Virchows Arch*. 2021 Mar;478(3):507-516.

5. 参考資料：補表

補表1 各種セルブロック法* (五十音順)

遠心分離細胞収集	細胞凝固・固化
遠心管法（試験管法）	アルギン酸ナトリウム法
遠沈管法	寒天法
クライオバイアル法	グルコマンナン法
クロロホルム重層法	セルロース法
コロジオンバック法	ゼラチン法
サンプルチップ法	フィブリン析出法
綿棒チューブ法	ポリエチレングリコール法
パラフィン・寒天サンドイッチ法	ポリビニールアルコール法

*日本臨床細胞学会実施全国アンケート結果に基づき，実証データでは遠心管法とアルギン酸ナトリウム法を用いて検討した。

補表2 主なセルブロック作製法

工程	遠心管法（試験管法）#	アルギン酸ナトリウム法
1	細胞浮遊液を 3,000 rpm, 3 分間 遠心分離	細胞浮遊液を 3,000 rpm, 3 分間 遠心分離
2	上清を除去	上清を除去
3	10%NBF を用いて 24 時間重層固定	10%NBF を用いて浮遊固定* (LBC 検体は各社保存液で少なくとも 1 晩浮遊固定)**
4	ホルマリンを除去	蒸留水にて洗浄 3,000rpm, 5 分間 遠心分離
5	—	1%アルギン酸ナトリウム数滴（約 0.5ml）添加後 によく混和
6	—	3,000rpm, 5 分間 遠心分離 上清除去
7	容器上部にて水平に割断	1 M 塩化カルシウムを 2~3 滴加え固化（数分）
8	沈渣を容れた容器ごと垂直割断面作製	蒸留水を入れ沈渣を浮遊させる
9	脱水・パラフィン浸透	脱水・パラフィン浸透
10	割断面にて包埋	包埋

#：10% NBF 重層・垂直割断面観察法

*：固定時間は 6~24 時間程度が望ましい

**：LBC 保存液からホルマリン再固定が不要な場合もある

補表 3 LBC 標本作製法の比較

標本作製法	フィルター転写法		遠心沈降法		
	ホロジック社	ロシュ社	BD 社	MBL 社	武藤化学社
メーカー名	ホロジック社	ロシュ社	BD 社	MBL 社	武藤化学社
製品名	ThinPrep	Cellprep	SurePath	TACAS	LBC PREP
自動塗抹機器	有	有	有	有	無
用手法	不可	不可	可	可	可
スライドガラス	専用	専用	専用	専用	専用
固定液	2 種類	5 種類	2 種類	3 種類	2 種類
最低固定時間*	15 分以上	30 分以上	30 分以上	30 分以上	30 分以上

*：一晩 LBC 保存液で固定すると安定した細胞像が得られる。

BD 社：ベクトン・ディッキンソン社

MBL 社：医学生物学研究所社

補表 4 LBC 保存液の組成および成分*

各種 LBC 保存液	化学名または一般名				
	エタノール	メタノール	ホルムアルデヒド	イソプロパノール	エチレングリコール
ThinPrep (ホロジック社) 婦人科用プレザーブサイト液 非婦人科用プレザーブサイト液		35~55%			
Cellprep (ロシュ社) 婦人科用・口腔用, 呼吸器用, 尿・髄液用, 穿刺吸引・体腔液用 尿用バイアル (Type D)	26~31% 67%				2~3% 2%**
SurePath (BD 社) 婦人科・口腔用シュアパス保存液 非婦人科用サイトリッチレッド	20~25%	1~2% 8~9%	0.4~0.5%	1~1.5% 18~20%	7~8%
TACAS (MBL 社) 婦人科用 GYN Vial 非婦人科用 Amber 非婦人科用 Ruby	20~30% 40~50% 20~30%	<10% <10% <10%	≤1.0%		
LBC PREP (武藤化学社) 婦人科用 LBC プレップ 非婦人科用 LBC プレップ 2		30% 30%	0.09%		

*安全データシート (SDS) 情報を参考に作成

**ポリエチレングリコール

BD 社: ベクトン・ディッキンソン社

MBL 社: 医学生物学研究所社

