

# 総 説

## 美しい細胞診標本とは

- Papanicolaou 染色と Giemsa 染色について -

## Beautiful cytological specimen

- Papanicolaou stain and Giemsa stain -

神戸常盤大学保健科学部

医療検査学科 畠 榮

佐野太亮, 布引 治

細胞診検査の基本となる美しい Papanicolaou (Pap) 染色と Giemsa 染色の細胞像は、症例検討会や学会でのプレゼンテーション、学生講義、さらには論文投稿の際に欠かすことができない。そのためにもまず美しい細胞診標本がなくては、いかに写真撮影の技術やセンスがあろうとなしえないことである。美しい細胞診標本とは、染色性や細胞の形態が保持された状態はもとより、細胞の分化方向、細胞が有している機能が読み取れるもの、すなわち美しいとは真なる形態の枢要をなすと考える。今回は美しい Pap 染色ならびに Giemsa 染色とはどのようなものかについて述べる。

Pap 染色は、癌細胞と診断するとき最も重要視される核クロマチンが良好に染色され観察でき、分子量の異なった酸性色素の組み合わせることで、分化の異なる扁平上皮細胞が染め分けされ、しかも集合重積した個々の細胞を観察することができる透過性の良好な染色方法である。このような染色性の特徴を保持するためには、湿潤固定が不可欠な条件となる。

一方 Giemsa 染色は、Pap 染色に比べ細胞は大型、平坦となるため、白血病やリンパ腫の診断において細胞質の性状や核形の観察が容易である。Giemsa 液には、塩基性色素としてメチレンブルーやアズール B 等の少し紫色をおびた青色調のチアジン系色素と赤橙色の酸性色素のエオシン Y が含まれる。このため Giemsa 染色は単に青色と赤橙色のみでなく血液細胞を多彩な色調に染め分けることが可能となる。またメタクロマジー (異染性) を示すことも特徴であり、間質性粘液、基底膜様物質などの鑑別に役立つ。

**Key word: 美しさ, Papanicolaou 染色, Giemsa 染色**

著者連絡先: 〒653-0838 兵庫県神戸市長田区大谷町 2-6-2  
神戸常盤大学保健科学部 医療検査学科

## はじめに

美しい細胞診標本とは形態学的な美しさだけでなく、その形態から細胞の分化方向や機能が読み取れる真なる形態の枢要をなすものと考え、そこで細胞診で用いられる標準的染色法として用いられる Pap 染色と Giemsa 染色について述べる。

Pap 染色はアルコールによる湿固定を行い、ヘマトキシリン液、OC 液、EA 液で染色する。Giemsa 染色では冷風し乾燥固定を行いメチレン青とエオシンの二種類の染色液で染色する。このように Pap 染色と Giemsa 染色は固定方法から染色液まで全く異なる染色法である。両者を比較した場合、それぞれに相異なる長所と短所を有しており、一概にどちらの染色法が優れていると言いはない。細胞診で用いられている湿固定では、核内の水分子が脱水されることによりエタノールに溶解しにくい核酸が核内で集積され、高次クロマチン構造が顕著になる(図 1)、細胞診検体から美しい標本を作製するためには、Pap 染色と Giemsa 染色の理論を知る必要がある。

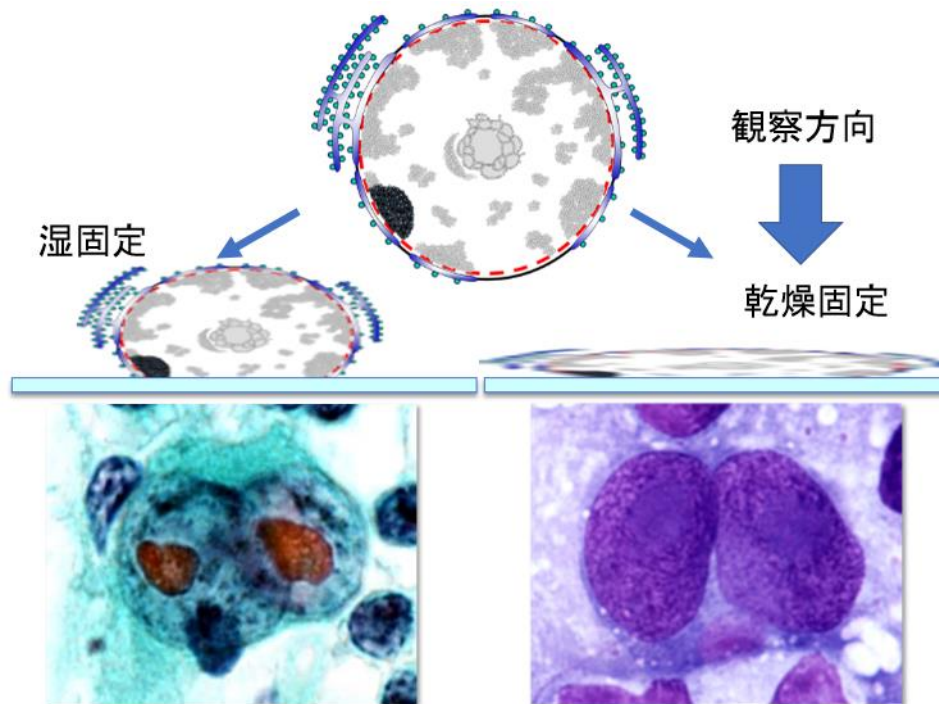


図 1 ホジキンリンパ腫で認められるリード・シュテルンベルグ(ステルンベルグ)細胞の湿固定と乾燥固定の核での高次クロマチン構造

### I. 美しい Papanicolaou 染色標本を得るための理論

当初 Dr. Papanicolaou は、細胞の観察に hematoxylin eosin 染色を用いていた。1940 年には Shorr らがホルモン細胞診用に Masson trichrome 染色の Goldner 変法を改良し、ライトグリーン、オレンジ G 混合染色法を用いた Shorr 染色を開発した。さらに Shorr は 1941 年、細胞質の染色液としてオレンジ G、ビーブリッヒスカーレット、ファーストグリーンを 1 つの染色液として混合することに

成功し、簡便法をサイエンス誌に発表した。1942年、Dr. Papanicolaou は Shorr 染色をさらに改良し、ハリスのヘマトキシリン、オレンジ G、ライトグリーン、ビスマルクブラウン、エオシンを染色剤とする方法を、Pap 染色としてサイエンス誌に発表した<sup>1,2)</sup>。Pap 染色の特徴としては、癌細胞と診断するとき、最も重要視される核クロマチンが良好に染色され観察できること、また分子量の異なった酸性色素を組み合わせることにより、扁平上皮細胞の分化による細胞質の染め分けが可能になる。Giemsa 染色で観察困難な集合重積した細胞集塊も、Pap 染色では透明感のある染まりが得られ詳細な観察が可能となる。

## 1. Papanicolaou 染色 異なる分子サイズの酸性色素による染め分け

種々の酸性色素の使用により多染性の効果が得られるのが Pap 染色の特長である。性質の異なる細胞質や赤血球にどの酸性色素が結合するかはその色素分子の大きさと細胞質の構築の疎密が大きく関与していると考えられる。細胞質を染色する酸性色素の分子の大きさは、オレンジ G < エオシン Y < ライトグリーンの順になる<sup>(図 2)</sup>。この 3 種類の酸性色素の中で最も分子の小さなオレンジ G が構築密な角化扁平上皮細胞の細胞質を染める。角化細胞質に染まったオレンジ G の染まりの強さは、細胞の角質化の程度を推測することが可能となる。構築が疎な部位には大小いずれの色素も入り込み結合するが、一般的に小分子の色素は分子運動が活発で、細胞質との間に安定した結合が起きにくい。一方大きな分子のライトグリーンは分子運動が緩慢であるが、一旦疎の部位へ入り込むと強く結合すると考えられる。分子の大きさが中間のエオシン Y は中間の挙動を示す。EA-50 液には、塩基性色素であるビスマルクブラウンが含まれている。この色素は類脂質を染色するが、細胞質の染色性には関与しないと考えられている<sup>(図 2)</sup>。

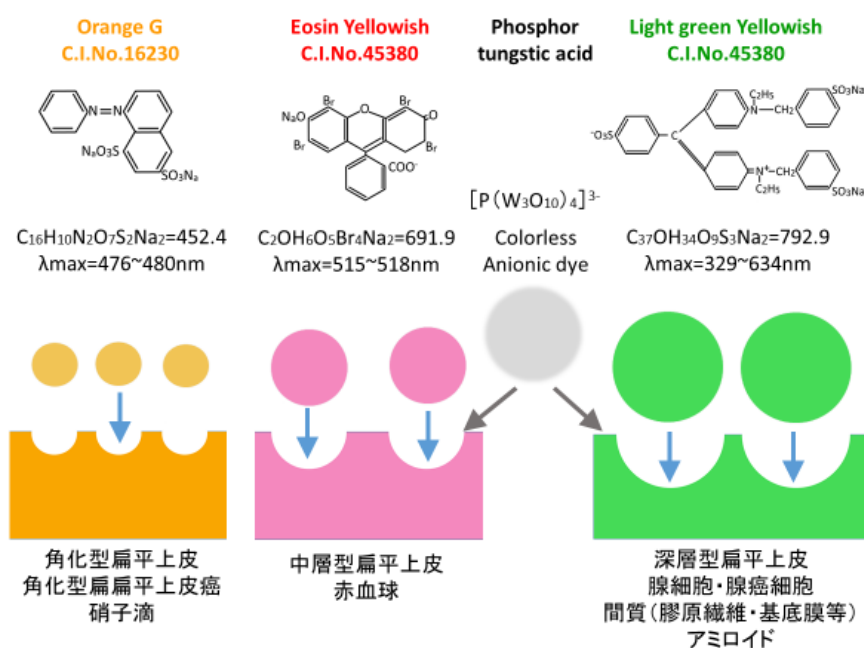
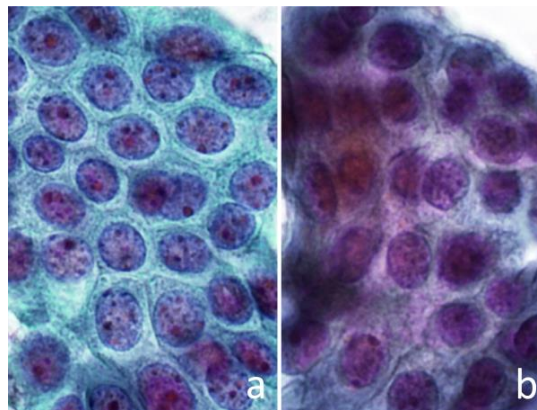


図 1 Pap 染色の原理

リンタングステン酸は水の中では大きな陰イオン性錯体であり、酸性色素のエオシン Y やライトグリーンと同じ化学的挙動を示す。従って、陰イオン性のリンタングステン酸は、正に荷電するタンパク質のアミノ基に親和する。この無色のリンタングステン酸は、オレンジG, エオシン, ライトグリーンと一緒に拡散して競合し細胞質のタンパク質と結合することで各色素の重複を防ぐ選択的染色作用を示すと考えられる **3)**。Baker はこのような働きをするリンタングステン酸を **"Colorless anionic dye"** (無色の陰イオン性色素)と呼んでいる **4)**。Pap 染色では、無色透明のリンタングステン酸を使用することにより細胞質タンパク質と色素の結合割合が少なくなり、透明感の強調された染色結果を得ることができる **(図 3)5)**。



**図 3** リンタングステン酸は、酸性色素と競合し細胞質タンパク質と結合し、選択的染色作用を示すことで、Pap 染色で重要な重責性を示す集塊の内部構造が把握できる透明感を得ることができる。

肺腺癌 a:リンタングステン酸使用, b:リンタングステン酸不使用 Pap 染色×100

## 2. ヘマトキシリンと核染色

ヘマトキシリン液は、pH の違いにより pH2.4~2.5 の進行性ヘマトキシリンと pH2.7~3.0 の退行性ヘマトキシリンに大別される。pH の高い退行性のヘマトキシリンは、核内のリン酸基ならびに細胞質のカルボキシル基と結合するため分別が必要となる。Gill や Carrazzy などの退行性ヘマトキシリンは、クロマチン構造が詳細に染色されるため細胞診診断の基本的所見である核染色に用いられる。つまり進行性のヘマトキシリン染色液は、pH 領域が pH2.5 以下のためリン酸塩基が豊富な DNA を選択的に染色する。一方で退行性のヘマトキシリンは、pH が高いためカルボキシル基に富むタンパク質とも結合するので分別が必要となる、核を美しく染めるためにはヘマトキシリンの pH が重要である **(図 4)**。

進行性ヘマトキシリン  
pH2.4~2.5

退行性ヘマトキシリン  
pH2.7~3.0

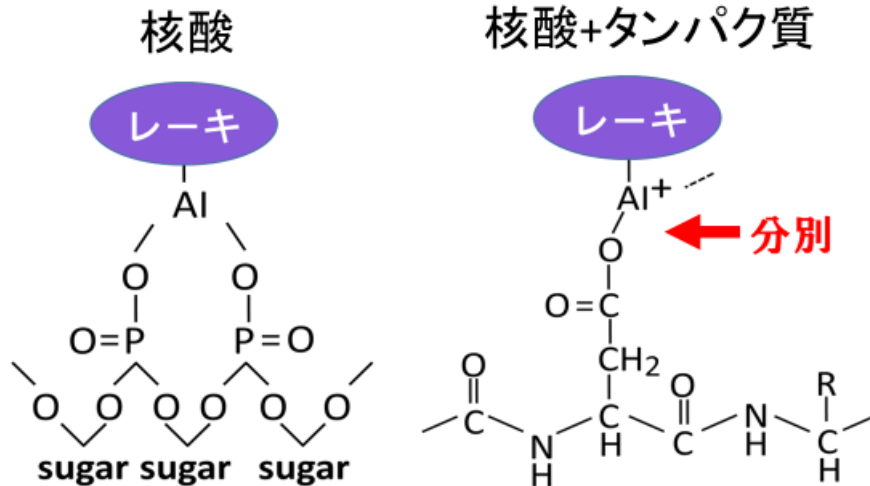


図4 pHの高い退行性のヘマトキシリンは、核内のリン酸基ならびに細胞質のカルボキシル基と結合するため分別が必要となる。

ヘマトキシリン染色液は酸性のため、分別のままでは pH が低いため染色部位は赤褐色を呈する。ヘマトキシリンは pH 指示薬に使用されるように pH により色が変わる。ヘマトキシリン水溶液は pH4~5 で黄色、pH6~7 で赤色を呈する。酸が残っていると、核に結合しているレーキが水素イオンと交換してしまい退色する。そこで核を美しく染色するには色出しが重要である。水洗や中和により pH 値を高くすると、核は美しい青色を呈する(図4)。

## II. 美しい Giemsa 染色標本を得るための原理

Giemsa 染色の染色原理は Pap 染色に比べてやや複雑であり、メチレン青とエオシンの二種類の色素による正染性染色とメチレン青の酸化によって生じるメチレンアズールのアズール A, アズール B, アズール C の混合物からなる。Giemsa 染色の特徴は、メチレン青やエオシンの正染性と二種類のメチレンアズールによって多彩な色調が作り出される。この多染性によって、核は青、青紫、紫、赤紫などのさまざまな色調に染まり、細胞質は淡いピンク、淡い青、淡い紫などに染まる<sup>3)</sup>。また間質の粘液様基質や軟骨基質などは、アズール B の異染性によって赤や紫に染まる Romanowsky 現象を呈する(図5)。

Giemsa 染色の最大の長所は、Pap 染色に比べると細胞質内の顆粒の観察が容易なことである。白血球の顆粒をはじめ、種々の分泌顆粒、神経内分泌顆粒、リポフスチン顆粒などのさまざまな細胞質内顆粒を容易に識別できる。このほか基底膜成分や間質の基質成分などが Giemsa 染色の異染性によって鮮やかな赤~赤紫に染まり識別が容易であることも長所の1つである。ただ

し, Pap 染色と比べると角化細胞が明確に判定できないため観察には不向きである. また Giemsa 染色でも核異型の評価は一程度可能であるが, Pap 染色に比べると核形, クロマチンや核小体および重積した細胞集塊の観察などが困難である.

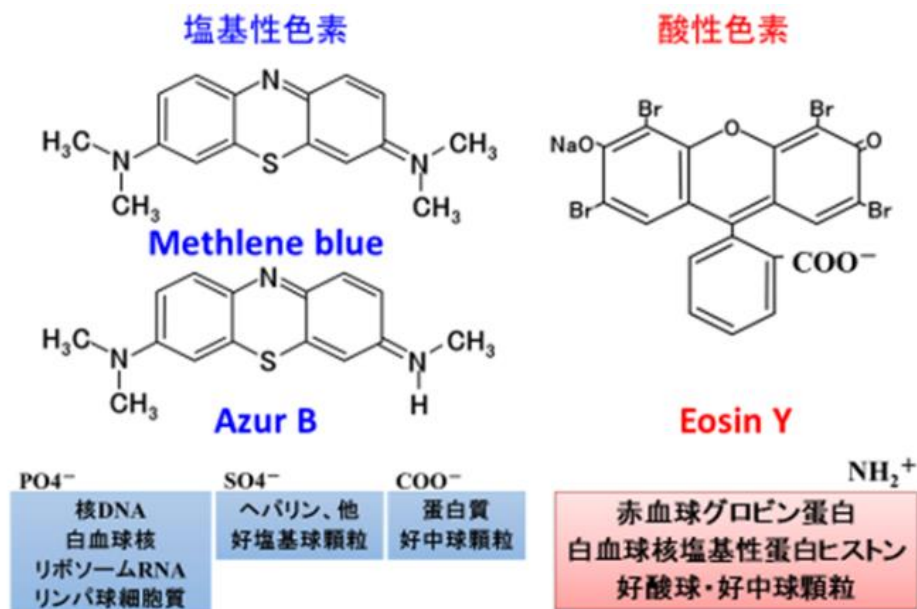


図 5 Giemsa 染色のメカニズム

### 3. メタクロマジー —その原理—

メタクロマジーの原理には諸説あるが, 負に荷電した陰性官能基に正に荷電した塩基性色素がイオン結合することで, 色素同士の疎水結合やファンデルワース力により色素同士がポリマー状に結合し, 本来よりエネルギーレベルが高い低波長の光を吸収するため, 本来の青色の色調とは異なる紫色を呈する. メタクロマジーは陰性官能基の種類により効果が異なる. ヒアルロン酸は, 陰性官能基であるカルボキシル基を一つしか有さないため反応基間の距離が  $10.3 \text{ \AA}$  で, 色素がポリマーを形成しにくいいため, 弱いメタクロマジーしか呈さない. それに対してカルボキシル基と硫酸基を有するコンドロイチン硫酸 A やコンドロイチン C を含む基底膜物質は, 官能基の距離が  $4 \text{ \AA}$  ないし  $6 \text{ \AA}$  で色素がポリマー状に結合し強いメタクロマジーを呈するようになると考えられている(図 6).

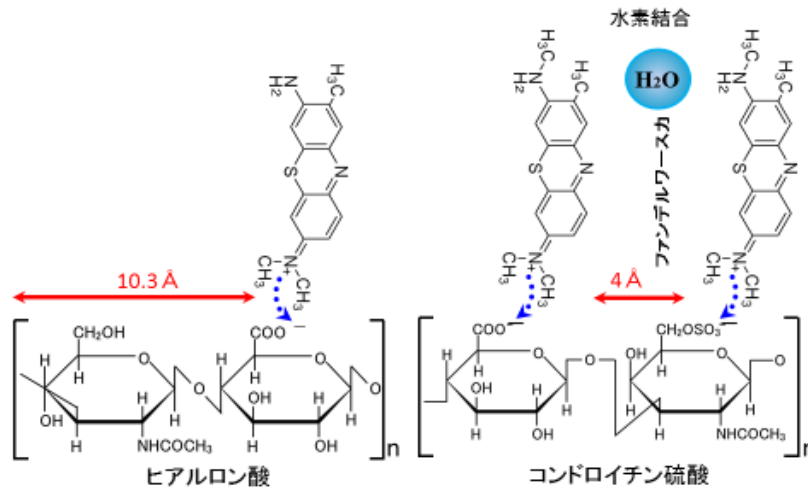


図6 ヒアルロン酸には陰性官能基であるカルボキシル基-COOH を一つしか有さないため弱いメタクロマジーしか呈さない。コンドロイチン硫酸などではカルボキシル基と硫酸基を有するため強いメタクロマジーを呈するようになる(文献5より引用)。

### III. 美しい Pap 染色および Giemsa 染色とは

Pap 染色と Giemsa 染色では相互の短所を補い合う長所を有している。Pap 染色と Giemsa 染色で観察容易な所見の比較を表1に示す。美しい細胞診標本とはその形態から細胞の分化方向や機能が把握することができる標本こそが真の美しい細胞像と考えここに述べる(6)。

	Papanicolaou染色	Giemsa染色
固定	95%アルコール	乾燥
細胞の大きさ	小型	大型(約14)
細胞集塊	立体的, 透明感	平面的
構造観察	可能	不明瞭
細胞質		
角化	明瞭 (ハロウィーンオレンジ色)	不明瞭 (透明感のあるrobin egg blue色)
粘液顆粒	観察困難	明瞭
神経内分泌顆粒	観察困難	明瞭
細胞傷害物質	観察困難	明瞭
脂肪	明瞭	明瞭
核形態	明瞭	明瞭
核クロマチン	明瞭	不明瞭
核小体	明瞭	不明瞭
核縁	まれ	不明瞭
変性空胞	不適	明瞭
血液細胞の同定	不明瞭	優れる
細胞外物質	明瞭	明瞭
ECM	観察困難	明瞭
異染性	無し	明瞭

表1 Pap 染色と Giemsa 染色の差異を表に示す。



## 1. 細胞集塊の所見

細胞診のスクリーニングでは、不規則重積性を呈する細胞集団や同一細胞で構成される細胞集団などの細胞所見がみつければ必ず強拡大で観察しなければならない。Giemsa 染色は、重積した細胞集塊の中で個々の細胞や細胞集塊の立体構造を観察する場合には詳細な観察が困難である。一方 Pap 染色は、選択的染色性を示し透明感を有しているため内部構造を詳細に観察することが可能となる。

肺腺癌や乳癌、卵巣の明細胞癌が体腔に播種した場合には、平面内極性 (planar cell polarity: PCP) を有し apical 側を外側としたボール状の集塊を形成することがある。これらには充実性集塊と一層の細胞で縁取られた風船状の二種類の集塊が観察され、後者の集塊をミラーボール状集塊と表現し区別している。明細胞癌のミラーボール集塊は、細胞集塊の内側に細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) を産生するため細胞外基質成分を有する type II の collagenous stroma として観察され、Giemsa 染色で強い異染性を示す。甲状腺乳頭癌でも中空状の球状集塊 (ミラーボール状集塊) として出現する (図 7a)。個々の腫瘍細胞はライトグリーン好性の比較的豊富な細胞質をもち、一部では隔壁性細胞質内腔を有する (図 7b)。集塊の辺縁には細胞の先端が外方に突出し、鋸あるいは釘に似たホブネイル状の細胞もみられる。集塊を構成する細胞の多くは不整形核を有し、核内細胞質封入体像も認められることがある。

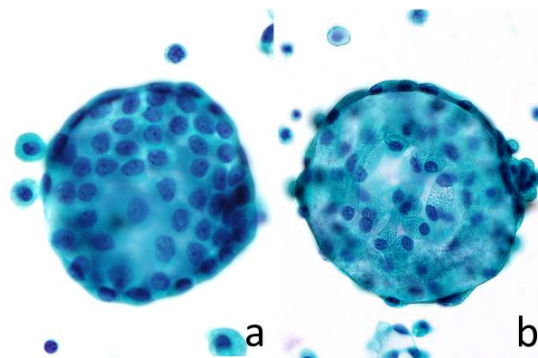
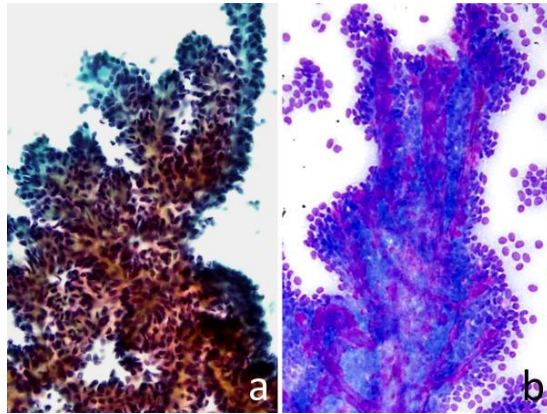


図 7 甲状腺乳頭癌の胸水播種 中空状のミラーボール状集塊 bのミラーボール状集塊を構成する細胞には隔壁性細胞質内空が認められる。 a,b Pap×20

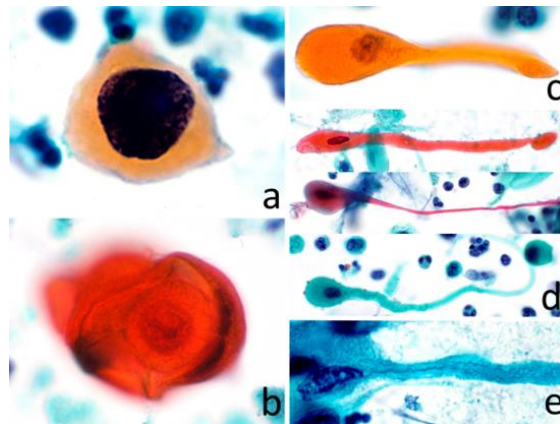
腺充実性偽乳頭状腫瘍 (solid-pseudopapillary neoplasm: SPN) は比較的稀な腫瘍で、血管間質の周囲にのみ腫瘍細胞が残存し、一見乳頭状構築に類似した像を呈する。このような構造を偽乳頭状構築と呼ぶ。Giemsa 染色では血管周囲の ECM が異染性を呈し、集塊内部に存在する血管を明確に判定することができる (図 8)。



**図 8** SPN で認められた偽乳頭構造 Giemsa 染色では血管周囲の ECM が異染性を呈し, 集塊内部に存在する血管を明確に判定することができる. a: Pap 染色×10, b: Giemsa 染色×10

## 2. 細胞質の所見

角化型の扁平上皮癌では, オタマジヤクシ型, ヘビ型, 線維型, 奇怪型や無核角化細胞などを認める. 角化細胞はオレンジ G で美しいパンプキンオレンジ色に好染する. 角化型扁平上皮癌の細胞質は Giemsa 染色で透き通る駒鳥の卵の色 (translucent robin's egg blue) として観察されるが, 角化と判断するには困難なことがある(図 9).



**図 9** 扁平上皮癌の特徴 a: インディアンインク状の核 Pap 染色×100, b: 相互封入 Pap 染色×40, c: オタマジヤクシ細胞 Pap 染色×40, d: ヘビ型細胞 Pap 染色×40, e: Herxheimer の螺旋体 Pap 染色×100.

## 3. 粘液産生性腺癌

婦人科領域で粘液を産生する腺癌のなかでは内頸部型腺癌は最も頻度が高く, 一般的に遭遇する腺癌である. 子宮頸部腺癌は円柱状で酸性粘液のスルホムチンを有するためヘマトキシリンに淡染する. 胃型腺癌の一つである最小偏倚腺癌の出現形態や核所見は, 上皮内腺癌や微小浸潤腺癌にきわめて類似しており, 細胞診の限界がうかがわれる. しかし, 興味ある所見として, 上皮内腺癌や微小浸潤腺癌では細胞質内の粘液がヘマトキシリン好性であったのに対して, 分葉状

頸管腺過形成 (Lobular endocervical glandular hyperplasia: LEGH) ならびに最小偏倚腺癌では、中性粘液を有するため黄色調に染色され鑑別の一助になる(図 10)7)。LEGH や子宮頸部幽門腺化生では被蓋細胞は産生粘液のシアロムチンを含むためヘマトキシリンで淡染するが、子宮頸部腺の開口部を構成する細胞は胃型粘液を産生するため、黄色の菊花様の特徴ある所見を示す。

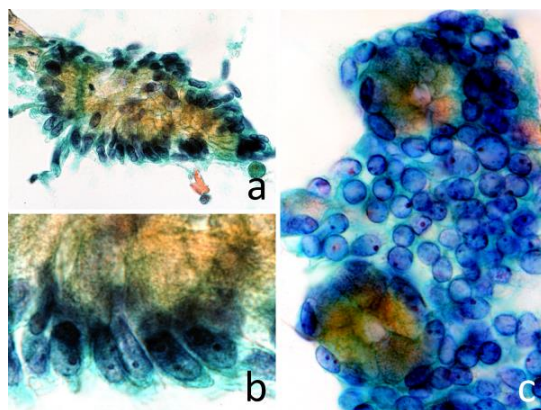


図 10 黄金色の粘液を有する子宮頸部腺細胞 a,b 最小偏倚腺癌, c LEGH/子宮頸部幽門腺化生 a~c: Pap 染色 a×20 b:×40 c:×40

#### 4. 細胞質内小腺腔および印環型細胞

細胞質内小腺腔は、境界明瞭な細胞質内空胞で、大きさは 3~12 $\mu$ m 大の空胞である。印環型細胞との鑑別は、境界が明瞭で周囲の細胞質が濃く染色され、核を圧迫していないことである。小腺腔内には、濃縮した粘液が滴状物として観察される。この滴状物は Pap 染色ではオレンジ G, エオシンあるいはライトグリーンに染まり、Giemsa 染色にて異染性を示すことからマジェンタ小体とよばれている。

細胞質のほとんどを占めるような大型単一空胞有する印環細胞型腺癌では粘液、中皮腫では間質性粘液のヒアルロン酸、脂肪肉腫では脂肪、悪性リンパ腫や反応性の形質細胞では免疫グロブリン、その他の変性空胞などさまざまな物質を有する。粘液を有する印環細胞型腺癌は一般的に胃と乳腺で認められる(図 11a~c)。胃の印環細胞癌転移症例においては、腹膜播種、肺の癌性リンパ管症、クルーケンベルク腫瘍などの形で進行する傾向がある。反応性中皮細胞ならびに悪性中皮腫細胞でも印環細胞認められ腺癌との鑑別を要することがある。中皮由来の印環細胞はヒアルロン酸を有するため Pap 染色でヘマトキシリンに淡染する。Giemsa 染色では、印環細胞内物質は異染性を呈し、顆粒状からび漫性の染色性を呈し腺癌で認められる上皮性粘液とは異なる染色性を示す。なお印環細胞の出現頻度は、反応性中皮症例では 5.1%、悪性中皮腫 59.7%である(図 11d~f)。

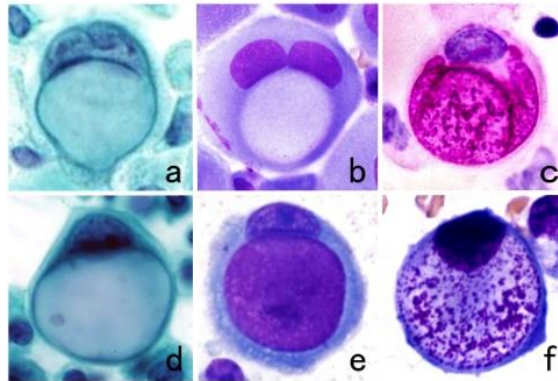


図 11 印環型細胞 a~c 胃印環細胞癌 d~f 悪性中皮腫で認められた印環細胞 a,d: Pap 染色 b,e,f: Giemsa 染色 c: PAS 反応 a~f×100

線毛と区別しなければならないものには偽線毛がある。偽線毛を有する腺癌細胞は、当初 Ebner により卵巣漿液性嚢胞腺癌例の腹水中に認めた線毛を有する腫瘍細胞として報告された 8)。しかし、この本体は細胞の遊離縁に形成された微絨毛で、真の線毛ではないことから現在では偽線毛と呼ばれている。偽線毛は電子顕微鏡では、発達した微絨毛の集簇からなる細胞質の王冠状の構造で、Pap 染色より Giemsa 染色でより明確に細胞質の一端に線毛様の構造物として観察される (図 12)。

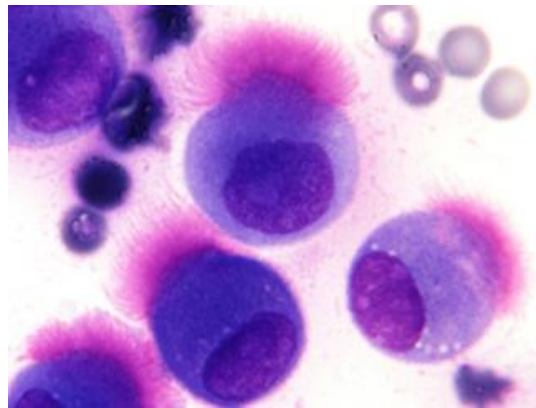


図 12 偽線毛: 腹水中に認められた胃腺癌細胞 Giemsa 染色×100

## 5. 細胞質内硝子滴

ライトグリーンに染まる均一で硝子様の滴状構造物は、硝子滴とよばれる。時に肝細胞癌や一部の腺癌細胞質内に観察されるが、他の多くの腫瘍でもみられ特異的ではない。その成分は細胞の種類により異なる。横紋筋肉腫ではボタン、形質細胞腫にみられる場合はラッセル小体 Russell body とよばれる。

1992 年、Wittchow らは、肺原発性小細胞癌の Giemsa 染色標本を検討し、89%の症例で細胞質内に好塩基性細胞質封入体 (paranuclear blue body) が認められ、診断的有用性があると報告

している 9). 我々の Pap 染色標本における検討結果では、同様のものと思われるライトグリーン好性で 1~4 $\mu$ m 大の細胞質封入体が、肺原発性小細胞癌の 88.6%に認められた(図 13). また、これらの小体は、肺以外にも膀胱, 前立腺, 子宮頸部, 子宮体部原発の小細胞癌でも認められる 10). 一方, このような好酸性細胞質封入体 (Eosinophilic cytoplasmic inclusions) は尿路上皮癌でも出現する. 尿路上皮癌で認められる好酸性細胞質封入体は, ECM の一成分であるラミニン 332 の構成鎖であるラミニン  $\gamma$ 2 鎖単で構成されていると考えられている 11).

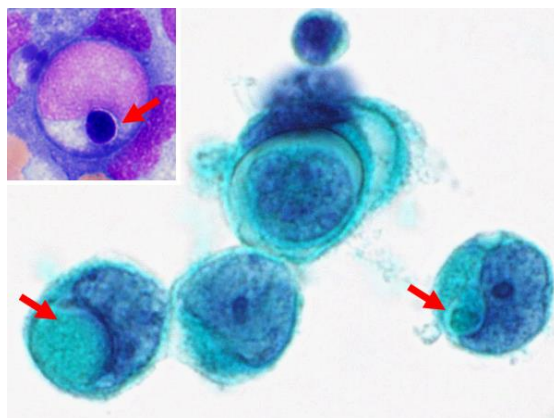
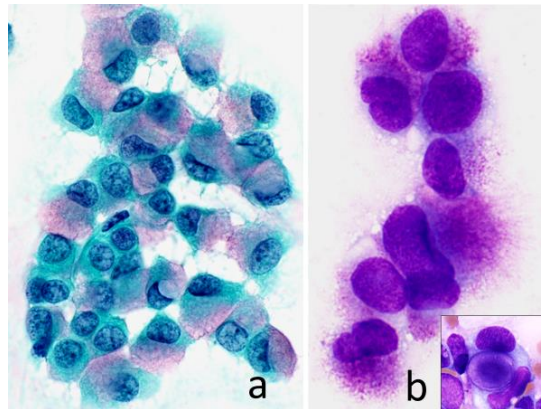


図 13 好塩基性細胞質封入体:胸水中に認められた小細胞癌 Pap 染色 $\times$ 100, b:Giemsa 染色 $\times$ 100 Insert Giemsa 染色 $\times$ 100

## 6. 細胞質内顆粒

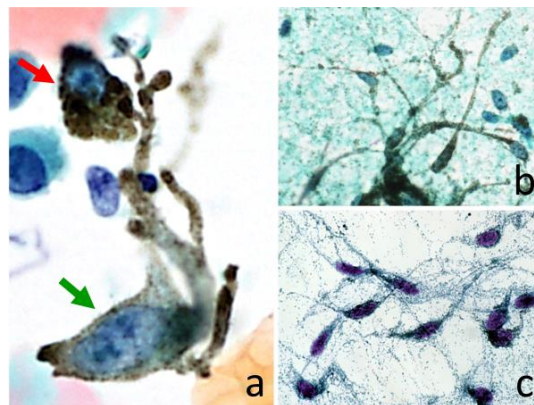
顆粒状細胞とは細胞質内に多数の微細あるいは粗な顆粒状物を有する細胞である. 細胞質が顆粒状になる理由が多い. 顆粒細胞腫はライソゾーム, 好酸性細胞腫はミトコンドリア, 腺房細胞癌はチモゲン顆粒を含むために光学顕微鏡で顆粒状の細胞質として認識できる. ミトコンドリアは細胞質内に微細顆粒状物質として認められ, 個々の粒子として識別されるよりも砂浜の砂がしめってキラキラ輝くように認められることより「Wet sandy pattern」とも呼ばれる. また副腎の皮質腫瘍や肝細胞癌, ライディヒ細胞腫などのステロイド分泌腫瘍は細胞質内に多くの滑面小胞体を含むため微細な顆粒状物の細胞質として認められる.

乳腺の solid papillary carcinoma: SPC は 1995 年に Maluf らによって提唱された充実性乳頭状の発育形式を示す特殊亜型で独立した分類として記載されている 12). SPC に特徴的所見として神経内分泌的性質が挙げられ, 腫瘍細胞は免疫染色にて chromogranin A, synaptophysin, NCAM などの神経内分泌マーカーに陽性を示す. 神経内分泌顆粒は, Pap 染色では観察することは困難であるが, Giemsa 染色では細胞質内に細かくて均一な好酸性の顆粒として認められる(図 14). SPC には粘液産生がなられることが多く, SPC の一部は粘液癌の前駆病変とも考えられている. SPC は免疫組織学的にホルモン高感受性, HER2 陰性を示し, intrinsic subtype では luminal A に相当する乳癌であるとされる.



**図 14** 神経内分泌顆粒は、Giemsa 染色では細胞質内に細かくて均一な好酸性の顆粒として認められるが、Pap 染色では観察できない。a: Pap 染色×100, b: Giemsa 染色×100 Insert Giemsa 染色×100

メラニン細胞は、樹状の突起を持つ細胞で、メラノサイトとも呼ばれ、チロシンからメラニンを生成する。腺癌の一型であるパジェット病は、近傍のメラノサイトから移入されたメラニン色素を細胞質内に含有するため悪性黒色腫との鑑別が困難である **図 15a**。



**図 15** メラニン顆粒を有する細胞 a: パジェット病で認められたメラニン細胞 (→) と Paget's 細胞 (→) Pap 染色×100 b,c 眼球に発生した悪性黒色腫 b: Pap 染色, c: Giemsa 染色×100

悪性黒色腫とは、皮膚、眼窩内組織、口腔粘膜上皮などに発生するメラノサイト由来の悪性腫瘍である。メラノサイト由来の腫瘍を診断する場合、メラノサイトが産生するメラニン顆粒の存在を証明することが必須となる。悪性黒色腫の細胞形態学的特徴としては、細胞質のメラニン色素、好酸性の大型核小体、細胞相互封入、核内細胞質封入体などがあがる。これらの所見は Pap 染色が Giemsa 染色より明瞭に観察することができる (**図 15b,c 図 16a,b**)。

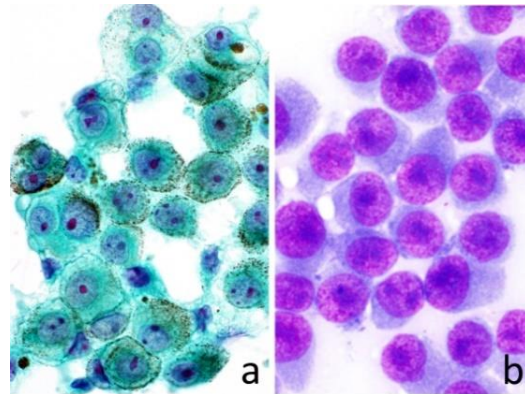


図 16 細胞質のメラニン色素, 好酸性の大型核小体, 細胞相互封入, 核内細胞質封入体などがあがる. a:Pap 染色×100, b:Giemsa 染色×100

## 7. 核の形態

Pap 染色では核膜や核小体の観察が容易である. 甲状腺の乳頭癌で見られる核溝や核内封入体は, 核膜の複雑な陥入によって生じる所見で乳頭癌の診断根拠として重要であるが, これ所見は Giemsa 染色よりも Pap 染色が容易に観察することができる. 核形態と関する疾患名を表 2 に示す.

核の形態	症例リスト
花環(花卉)状(wreath of nuclei)配列核	Touton巨大細胞(Touton giant cell) 中皮腫細胞(Mesothelioma) 配列核明細胞肉腫(Clear cell sarcoma)
カマキリ状核(Mantis-like nucleus)	悪性黒色腫(malignant melanoma)
切れ込み状核(cleaved)	B細胞性悪性リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma)
クラゲ状核(Jellyfish-like nucleus)、 腎形核(Kidney-shaped nucleus)、 馬蹄形(horseshoe-shaped nucleus)	未分化大細胞型リンパ腫(Anaplastic large cell lymphoma: ALCL)
クローバー状(Clover-like)	成人T細胞白血病/リンパ腫(adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL)
分葉状核(4分葉以上)	Multilobated リンパ腫 甲状腺の乳頭癌(Papillary Carcinoma of the Thyroid)
コーヒー豆状核(coffee-bean nuclei)	顆粒膜細胞腫(theca cell tumor) ブレンナー腫瘍(Brenner Tumor)
ソラメ状核(bean-shaped Nucleus)、 腎型(Kidney-shaped nucleus)	組織球(Macrophage)
ドーナツ状核(Doughnut nuclei)	未分化大細胞型リンパ腫(Anaplastic large cell lymphoma: ALCL)
ドラムティック(Drumsticks)	好中球(neutrophile)
脳回状核(convolution nucleus)	T細胞性悪性リンパ腫 (セザリー症候群Sezary syndromeで認められた Sezary cell)
馬蹄(horseshoe)形配列	結核症で認められるラングハンス型巨細胞(Langhans giant cell)
葉巻状核(Cigar-shaped nucleus)	平滑筋肉腫(Leiomyosarcoma)
バタフライ様、鉄アレイ様	急性前骨髄球性白血病(Acute Promyelocytic Leukemia:APL), M3,variant form, 2008WHO分類: APL:t(15:17)(q22;q21);PML-RARA
ポップコーン状核(popcorn nuclei)	ホジキンリンパ腫(Hodgkin lymphoma)
三日月形核組織球 (Crescent-shaped nucleus histiocyte)	亜急性壊死性リンパ節炎 節外性NK/T細胞リンパ腫(Extranodal NK/T-cell lymphoma: ENKL) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS:severe fever with thrombocytopenia syndrome)
金平糖状核(confetti-like nucleus)	甲状腺乳頭癌(液状化核体細胞診)

表 2 核形態と関する疾患名 (文献 13 細胞診ワンポイント講座より引用)

リンパ腫で核が多分葉の核異型を伴う症例を, 1979 年に Pinkus らは multilobated リンパ腫として 4 例報告した 14). 当時は T 細胞由来と考えられていたが, その後 1982 年から 85 年にかけて

B 細胞由来の multilobated リンパ腫が相次いで報告された。Multilobated リンパ腫の核はクローバー状の分葉を呈し、一部では 6 分葉以上の多分葉核が 5%前後認められる。これらの核は好中球の核のように核糸状のもので連結され、一点を中心とした菊の花びらのような構造を呈する(図 17)15)。このような核は成人T細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL) の腫瘍細胞でもみとめられる。ATLL の他の核形としては花弁状、クローバー状、脳回状、クルミ状とも呼ばれ、切れ込みやくびれが認められる。分葉形態を呈する核所見は、Pap 染色より Giemsa 染色でより明瞭に観察することができる。

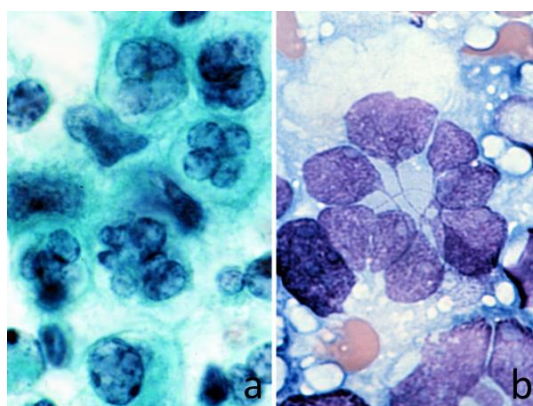


図 17 Multilobated リンパ腫の捺印細胞像：花びらまたはクローバー状の核を特徴とする：  
a: Pap 染色×100, b: Giemsa 染色×100

## 8. クロマチンパターン

核膜にヘテロクロマチンが凝集した状態が核縁である。扁平上皮癌では核縁の不規則な肥厚がみられやすい。均等に核縁が肥厚している場合は、悪性基準にはなりにくい。核縁の肥厚は湿固定標本では観察されやすいが、Giemsa 染色ではほとんど判断できない(図 1)。

クロマチンは核構造と相互作用していること、またクロマチンは核内に均一に存在しておらず、核内の特定の領域でその機能に対応したクロマチンドメインを形成していること、さらにクロマチンや核の構築は静止したものではなく、解離と結合を繰り返しながら存在するダイナミックなものである。クロマチン顆粒の大きさが不揃い、クロマチンの分布が不均一、極端に大きな凝集クロマチン、極端に明瞭なユークロマチン領域などは悪性を示唆する。表 3 に Pap 染色で認められるクロマチンパターンと関連する疾患名を示す。

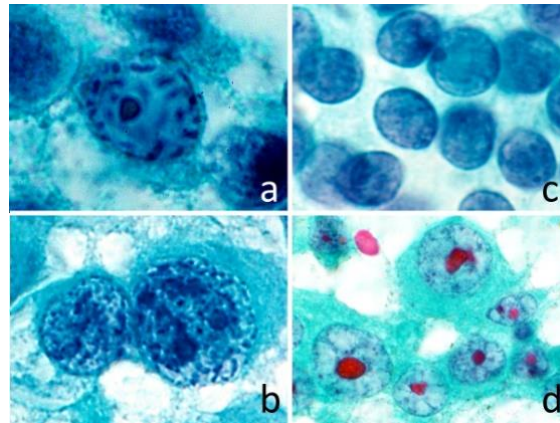


クロマチンパターン	疾患名
洗い出し状 (Washout chromatin)	乳癌 (髄様癌 medullary cancer) ホジキンリンパ腫 (Hodgkin's lymphoma)
毛糸玉状 (spireme) 、ローブ状	精母細胞性セミノーマ (spermatocytic seminoma)
インディアンインク (India(n) ink)	角化型扁平上皮癌 (keratinizing type squamous cell carcinoma)
キャタピラー細胞 (caterpillar cell)	心嚢液中皮細胞、Anitschkow's myocytes
魚網状 (fishnet chromatin)	パポパウイルス群に属するJCウイルスの感染
ごま塩状 (salt and pepper)	神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor)
車軸状、置時計様	多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma)、 髄外性形質細胞腫 (extramedullary plasmacytoma)
すすけたような核 (Smudged nuclei)	尿路上皮癌 (urothelial carcinoma)
すりガラス状核 (ground glass nuclei)	ウイルス感染 (特にヘルペス感染: herpes infection)
赤色 (Red chromatin)	炎症による変性した扁平上皮細胞
破砕状 (Fracture shape chromatin)	扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma)
粉末状 "Orphan Annie" nuclei (スリガラス状核)	甲状腺乳頭癌 (papillary adenocarcinoma of thyroid)

表 3 Pap 染色で認められるクロマチンパターンと関連する疾患名 (文献 13 細胞診ワークショップ講座より引用)

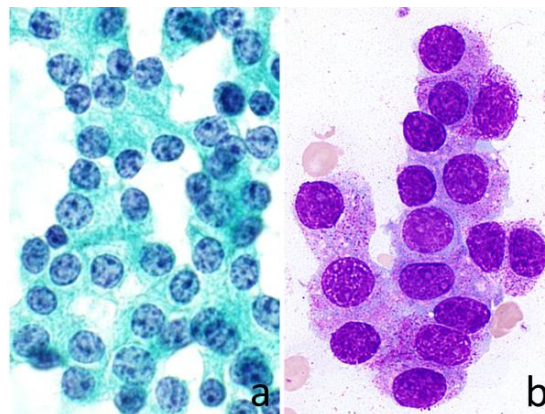
非角化細胞では、核が中央にあること、細胞質が厚いことで腺癌と鑑別する。高分化型扁平上皮癌や肺小細胞癌ではクロマチンが極端に濃染してインディアンインク状を呈する。

精母細胞性セミノーマでは 3 種類の大きさの異なる細胞で構成される腫瘍である。大型細胞や中型細胞には精母細胞に類似した毛糸玉状 (spireme pattern) と表現されるクロマチンが認められる (図 18a)。胚細胞腫とは異なり細胞質にグリコーゲンを含まないことが特徴的であり、PAS 染色が鑑別に有用である。胡麻塩状のクロマチンは、低異型度の神経内分泌腫瘍で認められ、形態上の特徴とされている (図 18b)。甲状腺乳頭癌ではすりガラス状核は、固定や切片作製時の人工的な所見と考えられ、特にホルマリン固定や Bouin 固定後のパラフィン切片に出現することが多い。細胞診材料では、微細なクロマチン (fine chromatin granules) として認識されるもので、組織切片とは見え方が少し異なる (図 18c)。洗い出し状クロマチン washout chromatin は、乳癌の髄様癌、子宮・卵巣の類内膜腺癌の morula 構成細胞、低悪性度胎児型肺癌/胚芽腫、臍芽腫、悪性黒色腫 (図 18d)、大腸腺癌で認められる。特にホジキンリンパ腫 (図 1) や髄様癌では洗い出し状クロマチンを呈するため、好酸性の大型核小体を認める。



**図 18** 特徴あるクロマチンパターンを呈する疾患 a: 精母細胞性セミノーマ, b: 神経内分泌腫瘍, c: 甲状腺乳頭癌, d: 悪性黒色腫 a~d: Pap 染色×100

ごま塩状クロマチンパターンは、カルチノイド、小細胞癌、甲状腺髄様癌、島細胞腫などの神経内分泌腫瘍に特徴的で、salt-and-pepper chromatin とよばれている。胡麻塩とは、焼き塩と炒りゴマを混ぜ合わせた調味料である。本来、塩は粒が小さく不均等であるが、ゴマ・塩・水の比率を1ずつ混ぜ合わせて炒ることで、塩を顆粒状にすることができ、均等な粒が得られる。神経内分泌腫瘍で特徴的とされているごま塩状クロマチンは、ヘテロクロマチンの顆粒に相当する「黒いゴマ」とユークロマチンの顆粒に相当する「塩」が混ざった、白と黒が混じったものの比喩として称されるものと考えられる(図 19a)。一方で神経内分泌腫瘍では、Giemsa 染色で好酸性の細胞質内顆粒が明瞭に観察されつため両染色の併用が求められる。



**図 19** 気管支擦過細胞診で認められたカルチノイド症例 Pap 染色では salt-and-pepper pattern のクロマチンが特徴である。Giemsa 染色では異染色性に対する神経内分泌顆粒が認められる。a: Pap 染色×100, b: Giemsa 染色×100

## 9. 核小体

核小体は胚細胞や動物精子以外のほとんどの真核細胞核に観察される核の中の最大の構造体である。核小体は転写活性のある rRNA 遺伝子を含む、核内の膜のない領域、リボソームが産

生され集まる最初の領域にあたる。その大きさは変化し、タンパク質合成が盛んな細胞ではよく発達している。核小体はリボソーム RNA 合成の場所であり、リボソームが最初に集まる場所でもある。細胞によっては1個以上の核小体を認める事がある。細胞学的には、肺腺癌、腎臓癌、乳腺の髓様癌やホジキンリンパ腫などの悪性細胞では、しばしば好酸性で周囲に明暈を有する大型核小体を認める。このように5 $\mu$ m以上で赤染するの核小体を cherry red nucleolus と表現する。

悪性黒色腫の細胞学的特徴としては、1)結合性が弱く、孤立散在性に出現し、一部では、相互封入像や柵状配列を呈する。2)クロマチンは顆粒状で均等分布し、核膜への凝集は少ない。3)多核巨細胞の出現、打ち抜き状核内空胞。4)好酸性の大型核小体を特徴とする。好酸性の大型核小体は悪性黒色腫の約半数の症例で出現する(図20)。

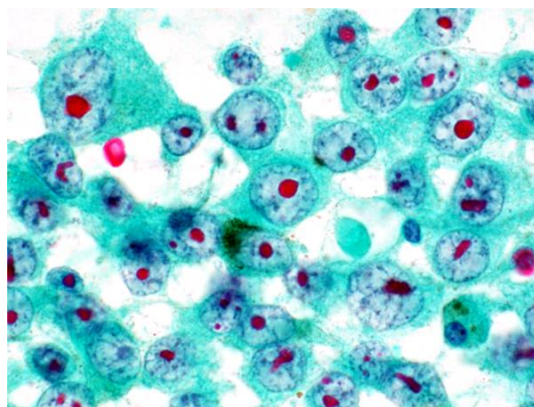


図20 悪性黒色腫の軟部腫瘍穿刺：サクランボ様大型核小体が特徴 Pap 染色 $\times$ 40

## 10. 細胞外の所見

### 1) 細胞外マトリックス (Extracellular matrix)

細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) は、すべての組織に存在する非細胞性の構成成分である。近年では、ECMは細胞にとって物理的な足場となるだけでなく、組織の形態形成、分化、ホメオスタシスに必要とされる重要な生化学的や生物力学的なシグナル伝達に関与すると考えられている。基本的にECMは水、タンパク質および多糖類で構成されているが、各組織には独自の組成や形態のECMが存在する。ECMは主に繊維状タンパク質とプロテオグリカンの二種類の高分子で構成されている。ECM中の主な繊維状タンパク質は、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニンである。PGは組織中で水和ゲルの状態となり、細胞外間質の隙間を埋める役割を担う。

間質の粘液様基質は、乳腺の線維腺腫や唾液腺の多形腺腫などで認められる。Giemsa染色では異染性によって鮮やかな赤色に染まり、Pap染色ではライトグリーンに淡染する。どちらでも観察は可能であるが、Pap染色では粘液との鑑別が難しい場合がある。

Giemsa染色では間質性粘液や基底膜様物質などは、メタクロマジーを示し鑑別に役立つ。例えば体腔液中に認められるヒアルロン酸は、Pap染色ではヘマトキシリンに淡染するが、Giemsa染色

では異染色性を呈する物質として観察できる(図 21). 胸膜中皮腫胸水中の非アルさんが 10 万 ng/ml 以上の症例では時に Giemsa 染色で異染色性を呈することがある(図 21b).

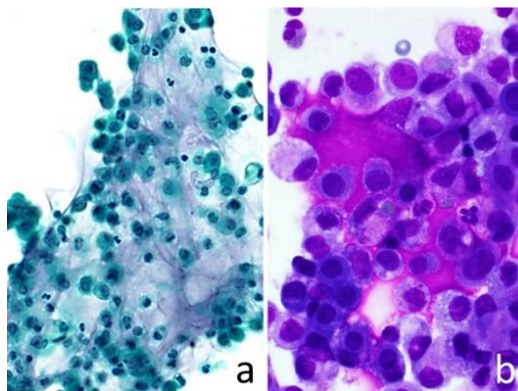


図 21 中皮腫の胸水: ヒアルロン酸は, 悪性胸膜中皮腫の腫瘍マーカーであり, 胸水でのヒアルロン酸の検出はこれを示唆する. 胸水の塗抹標本でも背景に異染色性を呈する物質として観察できる. . a: Pap 染色×10, b: Giemsa 染色×10

ヒアルロン酸は豊胸目的にわが国では頻繁に利用されている. しかし注入されたヒアルロン酸に対する組織球の反応や線維化などの異物肉芽腫が認められることがあるためヨーロッパ諸国では, この豊胸術は, 既に 2010 年に禁止されている(図 22). ヒアルロン酸注入による豊胸術で認められた肉芽腫症例

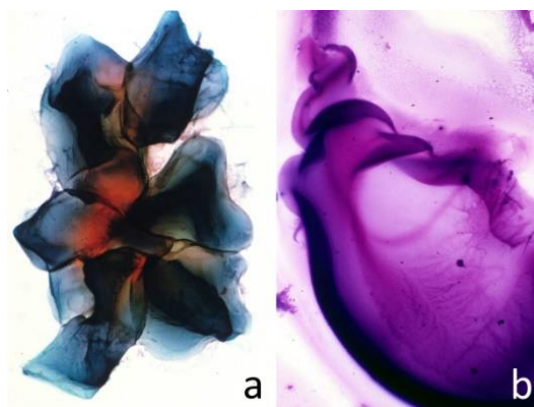


図 22 ヒアルロン酸注入による豊胸術で認められた肉芽腫症例. 乳腺穿刺吸引細胞診標本 Pap 染色では明確な判定は困難であるが, Giemsa 染色では異染色性を呈する. a: Pap 染色×10, b: Giemsa 染色×10)

体腔液細胞診材料でも卵巣の明細胞癌や中皮腫で細胞集塊中にコラーゲンや基底膜物質で構成される ECM を認める. これの ECM はライトグリーン好性の無構造物質として認められ “collagenous stroma”と表現されている(16). 中皮由来の ECM を有する細胞集塊は I~III 型に分類される. I 型は collagenous stroma の表面に菲薄で扁平な細胞を認める集塊で, 術中洗浄細胞

診検体中に多く出現し、疾患特異性はなく、手術操作などにより体腔壁から剥離した中皮細胞とその直下の結合織と推測される。表面に1~2層の立方状細胞を認めるII型は、中皮腫ではIII型コラーゲンを有し、卵巣原発の明細胞腺癌では基底膜物質を認める点で両者を鑑別する鍵になる(図23)17)。表面に3層以上の細胞を認めるIII型は、一部の反応性中皮や中皮腫で認められ、中皮細胞の特徴と考えられる。

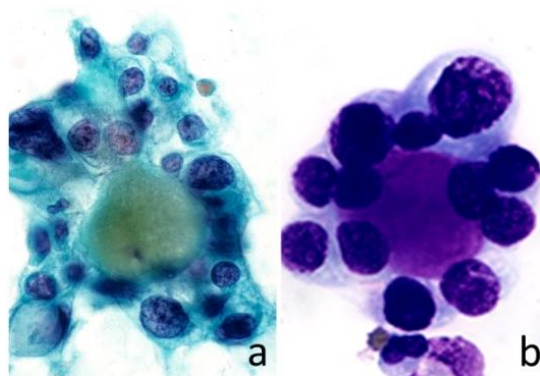


図23 卵巣明細胞癌は、type II collagenous stroma を特徴とする。a: Pap 染色×20, b: Giemsa 染色×20

篩型腺様嚢胞癌の特徴は異染性を示す gumballs, hyaline globules, cylinders と表現される間質性粘液で構成される硝子球を入れた篩状構造である。Pap 染色では淡染性で透明感があるため、この硝子球の周囲に腫瘍細胞が並んでいる所見はあたかも腺管様配列を模倣した形態を示す。篩状構造の内部には腫瘍性の筋上皮細胞が産生した基底膜様物質であるラミニンやIV型コラーゲンなどを含む。Giemsa 染色ではヘパラン硫酸プロテオグリカンのパールカンを有するため鮮やかなマゼンタ色を示す。一方、乳腺穿刺吸引細胞診の良性病変でも同様な構造物を認められ、硝子球 (Collagenous spherulosis) と呼ばれる。乳腺穿刺細胞診における硝子球は、筋上皮細胞が形成するため良性の指標となると考えられる18)。他にも多形腺腫でも異染性を呈する間質性粘液が認められるが、多形腺腫では辺縁が刷毛状を呈し不明瞭となる点異なる(図24)。

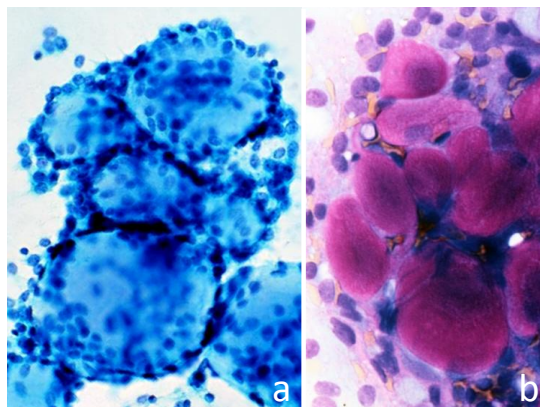


図24 腺様嚢胞癌で認められる粘液球：腺様嚢胞癌で認められる基底膜を構成するプロテオグ

リカンには、硫酸基を有するパールカンと呼ばれている ECM を含むため強い異染性を呈する。

a: Pap 染色×10, b: Giemsa 染色×10

## 2) その他の物質

その他背景に出現する物質としては、壊死物質、石灰化、甲状腺のコロイド、アミロイド、軟骨基質、類骨、lymphoglandular bodies など多くの所見がみられる。砂粒体は Pap 染色や Giemsa 染色での観察が容易である。甲状腺腫などの良性病変病変から穿刺された検体には、薄く引き伸ばされたフィルム状のコロイドを認める。コロイドは甲状腺の穿刺吸引細胞診の診断には大変重要で良悪性を鑑別するカギとなる。本質的に多くのコロイドは、良性病変で認められることが多い。Giemsa 染色で甲状腺のコロイドは、青紫色に染まり容易にコロイドと認識できるが、Pap 染色ではライトグリーン～黄色に染まり、他の成分との鑑別が困難である。コロイドは多くのパターンを示し、一般的には水様性で、スライドに均一に塗抹される。厚く塗抹した場合、乾燥してひび割れると蜘蛛の巣のような像を示し、ステンドグラスコロイドあるいはジグソーパズル様コロイドと表現する(図 25a)。リポフスチン顆粒は精嚢上皮や変性した甲状腺濾胞上皮などで見られ、Giemsa 染色では濃い青色に染まり Pap 染色では黄褐色に染まるが、色調の差から Giemsa 染色の方が見つけやすい。甲状腺の濾胞上皮のリポフスチン顆粒は paravacuolar granulation (PVG) とも呼ばれる(図 25b)。バセドウ病で見られる辺縁空胞は、甲状腺の機能亢進を示唆する所見で、Giemsa 染色ではピンク色に染まり観察が容易である(図 25c)。

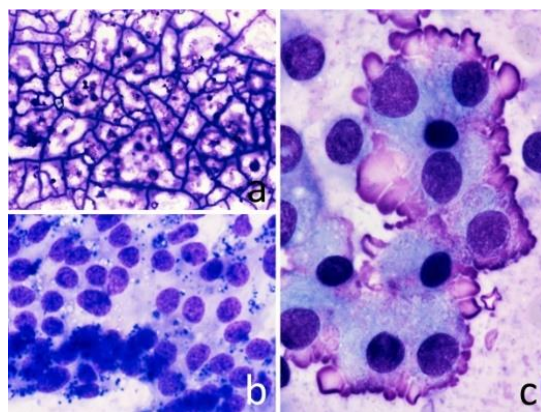


図 25 甲状腺穿刺吸引細胞での Giemsa 染色 a,b 腺腫様甲状腺腫 a:ステンドグラス (stained glass) コロイドあるいはジグソーパズル様コロイド b: 濾胞上皮のリポフスチン顆粒 (PVG) c: バセドウ病で認められた火焰様細胞 a:×10 b:×40 c:×100

精上皮腫, ユーイング肉腫, 横紋筋肉腫, 卵巣明細胞癌, 脊索腫などのグリコーゲンが豊富な腫瘍では、Giemsa 染色標本では、虎斑模様物質 (tigroid background や striped background と呼ばれている) の白と紫色の模様が観察される(19)。悪性リンパ腫では、lymphoglandular bodies (以下 LGBs) が認められる。LGBs は細胞質の破砕物で細胞質と同じ様な染色性を示す。その大きさは赤血球と同大かやや大型である。LGBs は悪性リンパ腫と診断する所見として重要ではある。し

かし、良性のリンパ節や濾胞性頸管炎でも出現するため確定診断とはならない(図 26)

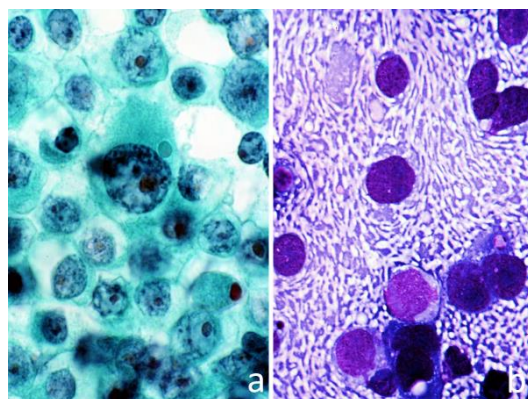


図 26 Tigroid background は、精上皮腫の乾燥固定 Giemsa 染色標本の背景に出現する白と紫色の構造物のことで、striped background とも呼ばれている。(左:Pap 染色×40, 右:Giemsa 染色×40)

通常細胞診に用いられている Pap 染色では細菌や真菌は染色性が弱く、強拡大での観察を強いられるが、Giemsa 染色では菌は好塩基性に染まり観察しやすい。一方 Giemsa 染色による陰性画像を呈するものには、1) 頭蓋咽頭腫や変性を伴う嚢胞内液などで認められるコレステロール結晶(図 27a), 2) 尿酸オキシダーゼ活性の消失により、難溶性物質である尿酸が結晶化し、関節に析出して痛風発作を誘発する。3) 結核菌などの抗酸菌では、細胞壁に存在するミコール酸のため親油性の弱い Giemsa 染色では陰性画像として観察され診断のカギとなる(図 27b)。

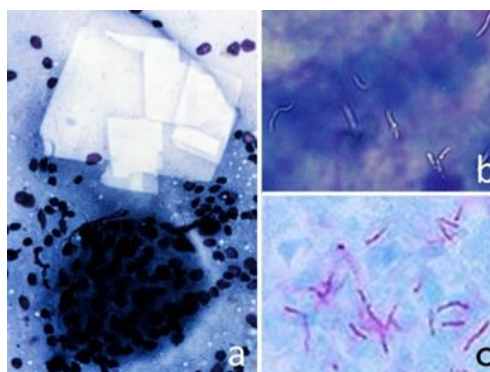


図 27 Giemsa 染色による陰性画像 a: 頭蓋咽頭腫 (内容液塗抹:未染色標本)頭蓋咽頭腫や変性を伴う嚢胞内液などで認められるコレステロール結晶 a:Giemsa 染色×10, b:Pap 染色×100, c:Ziehl-Neelsen 染色×100, b,c: 結核菌などの抗酸菌はミコール酸と呼ばれる脂質が細菌壁に大量に含まれているためフクシンなどの塩基性色素に染まりにくく陰性画像として認められる。

## IV 結語

細胞診断を正しく行うためには、美しい細胞診標本を作製するにはが不可欠である。そのため

には、技術的側面での向上心や臨床医と病理技師間での協力体制なしには決して行えない。今回紹介した美しい細胞診標本とは、染色性や細胞の形態が保持された状態はもとより、細胞の分化方向、細胞が有している機能が読み取れるもの、すなわち美しいとは真なる形態の枢要をなす細胞像と考える。

#### 文献

1. Papanicolaou G. N.: A new procedure for staining vaginal smears Science 95: 438-439, 1942
2. Papanicolaou G. N.: Atlas of Exfoliative Cytology by George N. Papanicolaou Clinical professor of anatomy emeritus, Cornell university medical college Published for The Commonwealth Fund by Harvard University Press, Cambridge, Moss., 5-6, 1954
3. 編集 田島基男 執筆 渡辺明朗: 染色理論の基礎知識 Papanicolaou 染色. パパニコロウ染色 ギムザ・ロマノフスキー染色 細胞診の基本 上巻 総論. 12-29, 1998
4. Baker J. R.: Principles of Biological Microtechnique. METHUEN & Co., Ltd., 1970
5. 鶴岡慎悟 パパニコロウ染色・ギムザ染色の基本操作とトラブル. MEDICAL TECHNOLOGY 43: 847-851, 2015
6. 編集 三上芳樹, 執筆 畠 榮 細胞診アトラス細胞診で使用する各種染色法. 9-23, 2021
7. Hata S, Mikami Y, Manabe T.: Diagnostic significance of endocervical glandular cells with "golden-yellow" mucin on pap smear. Diagn Cytopathol, 27: 80-84, 2002
8. Ebner, H. J. Untersuchungen zur cytologie und cytochemie cilioepithelialer tumorzellen im punktate seröser ovarialcystome und cystadenocarcinome . Zeitschrift für Krebsforschung. 59: 581~593, 1953
9. Wittchow, R., Laszewski, M. et al.: Paranuclear blue inclusions in metastatic undifferentiated small cell carcinoma in the bone marrow. Mod.Pathol.,5: 555-558, 1992
10. 畠 榮, 調 輝男: 神経内分泌腫瘍(小細胞癌)の細胞学的検討 —小細胞癌における細胞質封入体の診断的意義とその構造物質について—. 日臨細胞岡山支部会誌, 20: 21-23, 2001
11. 成富 真理, 畠 榮, 高須賀博久, 他: 胸水細胞診標本で好酸性細胞質封入体(eosinophilic cytoplasmic inclusion)を認めた右尿管原発尿路上皮癌の1例 日臨細胞誌 58: 172-177, 2019
12. Maluf H.M., Koemer F. C.: Solid papillary carcinoma of the breast. A form of intraductal carcinoma with endocrine differentiation frequently associated with mucinous carcinoma. Am J Surg Pathol, 19: 1237-1244, 1995
13. 畠 榮: 細胞診ワンポイント講座—知っていれば役立つ細胞所見 篠原出版新社, 東京, 2017
14. Pinkus, G. S., Said, J. W., Hargreaves, H.: Malignant lymphoma, T-cell type: A distinct morphologic variant with large multilobated nuclei, with a report of four cases. Am. J. Clin.



Pathol 1979; 72: 540~550.

15. 畠 榮, 坂東美奈子, 山口昌江. 他: Multilobated B 細胞リンパ腫—特に T 細胞リンパ腫の核構造との相違点について 日臨細胞誌 34; 1047-1053 1995
16. 畠 榮, 森谷卓也, 岩知道伸久, 他: 体腔液細胞診における collagenous stroma を有する細胞集塊について—形態学的特徴とその臨床学的意義—. 日臨細胞誌, 48: 312-318, 2009
17. 畠 榮, 鐵原拓雄, 三宅康之, 広川満良: 卵巣明細胞腺癌の細胞像 日臨細胞誌 35: 549-555, 1996
18. S. Hata, N. Kanomata, Y. Kozuka, M.,: Significance of collagenous and mucinous spherulosis in breast cytology specimens. Cytopathology. 21: 157-160, 2010
19. 有光佳苗, 鐵原拓雄, 畠 榮, 他: 精上皮腫に出現する tigroid background の細胞学的検討. 日臨細胞誌, 36: 132-135, 1997