

鉗子生検材料 (punch biopsy sample) の 薄切方法に関する一考察

川崎医科大学 人体病理学教室Ⅱ

真鍋 俊明, 津嘉山朝達, 山下 貢司
猪平 睦美, 竹中 恵子

(昭和58年11月22日受付)

Method of the Histological Search for Cancer Lesions within the Punch-Biopsied Samples

Toshiaki Manabe, Chotatsu Tsukayama
Koshi Yamashita, Mutsumi Inohira
and Keiko Takenaka

Second Department of Human Pathology
Kawasaki Medical School

(Accepted on November 22, 1983)

病理へ提出された生検材料の検索方法, 特に薄切方法に関しての報告は少ない。我々は胃鉗子生検材料を用いて, 通常の薄切方法ではどれほどの見落とし例, つまり **false negative** (偽陰性) があるかを調べた。次に **false negative** を最小限にとどめるための理想的な薄切方法を理論的に考察し, 理論と実際が一致するか否かを検討した。

臨床的に癌が疑われている場合, 生検組織の4分割相当の部分から切片を2~3枚ずつ作るようにし, その間の組織片は捨て去る。多数の組織片が同時に包埋されている場合には3/4分割目相当の切片を一番大きな組織片の厚さの半分以下の深さとするのが良いと考えた。直径4mmの生検材料中の1mmの癌病巣は, この方法でほぼ100%検出することが, 理論的に可能である。

A few reports have appeared on the question how to section the small biopsy samples. Using gastric biopsy materials, we estimated a false negativity for a routine method to be 7.3 percent.

An ideal method of sectioning blocks was theoretically sought to minimize a false negativity. Feasibility of this method was tested in the material from gastric biopsy specimen mentioned above. Based on our results, we recommend two quarter and center sections obtained by step-serial cut. The tissue between each cut may be discarded. When multiple samples are embedded within the same paraffin block, the depth of sectioning should be determined according to the size of the largest tissue material. By this procedure, a 1 mm diameter cancer lesion within 4 mm diameter biopsy material can be detected with a certainty of 100%.

Key Words ① Punch biopsy sample ② Sectioning procedure

序 言

盲目的あるいはエコー、透視下で組織を採る誘導針生検やコルポスコピー、または内視鏡下で行う直視的鉗子生検などは、病態を知る上に非常に有効な方法であり、確定診断がそれによる場合が多い。このようにして病理へ提出された生検材料の有用性に関する報告^{1)~9)}が多いにもかかわらず、提出された生検材料の検索方法に関する報告は案外少ないように思われる^{10)~12)}。

病理検査室では、指定されない限り、提出材料の一番広い面を切り出すことができるように包埋し、薄切する。しかしその薄切方法は、個々の検査室の習慣によってさまざまであるのが現状であろう。多くの検査室では、ランダムに数枚の切片を作るが、技師の人数・検体数に余裕のある検査室では数十枚の連続切片を作り検鏡するようにしている。また、厚さを変えて、数枚の切片を検鏡する検査室もある。

川崎医科大学附属病院病理部では、これまで一応、ルーチンに薄切切片3枚をこしらえて検鏡し、必要に応じて recut (再切切片), deep cut (深切切片), step cut (間隔をおいて得る連続切片), serial cut (いわゆる連続切片) をつくり、それらを診断の助けとしていた。この場合ルーチンの3枚の切片では、臨床的に疑われた病変に遭遇せず、さらに深く薄切された deep cut や step cut 等で初めて病巣にめぐりあうことが時々あった。そこで我々は、小さな生検材料が提出された場合、その中にある微小病変を検出するには、切片を最低何枚、どのようにしてこしらえればよいか疑問を持ち、まず通常の方法でどれほどの見落とし例、すなわち false negative (偽陰性) があるかを調べ、次に false negative を最小限にとどめるための理想的な薄切方法を、理論的に考察し、理論と実際が一致するか否かを検討することにした。勿論、一枚の組織切片に対しての病理医の診断能力自体もこれらの結果を左右する因子となりうるが、ここではその信頼性、正診率は別の機会に問題にすることとして、病変

を適確に検出できる薄切法についてのみ問題点をしぼることとした。

我々の目的は、薄切方法の違いによる病変検出率の差を認識すること、および現行の方法の信頼度の再確認であるため、通常の方法で最も検出率が高いと思われ、可視下で選択的に材料を得られる胃癌鉗子生検材料のみを今回の検討対象とした。このような材料では、理論的には他のものに比べて、false negative が少ないからである。あわせて、生検材料をパラフィンブロックとして残し、保存しておくことの必要性についても検討したので、それについても言及したい。

材料および方法

1978年から1980年の3年間に川崎医科大学附属病院病理部で取り扱った胃生検材料1421例の中から、臨床的に癌を疑いながら、組織診で悪性と確定できなかった症例78例を選び出した。これらのうちから組織の充分残っている症例を41例集め、全ての組織を4~6 μ mの厚さで薄切し、連続切片標本を作製した。41例の連続切片はすべて特定の人が検鏡し、そのうちの癌陽性症例については、ルーチン診断報告時の顕微鏡スライド (deep cut または step cut を含む) を再検討し、他の数人の本学病理医の意見を聞き、確認することにした。また、胃生検症例1421例の報告用紙ならびに顕微鏡スライドをすべて引き出し、染色された方法、スライドの枚数などを調べ、特殊染色を利用した頻度と、その価値についても検討した。

成 績

I False negative (偽陰性) 症例の検討

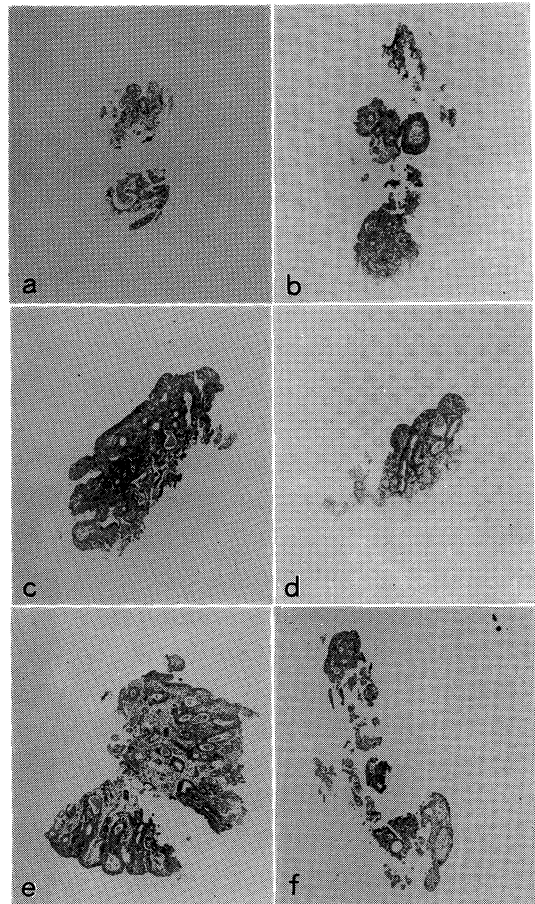
臨床的に癌が疑われ、組織診で胃生検組織診断基準 group III 以下として報告された41症例のうち再検討で Group V、つまり明らかに癌ありとされたもの3例を見つけ出した。すなわち、約7.3%の偽陰性率であった。これらの症例の内容を見ていくと次のごとくであった。

症例1: 提出された組織片は1個のみで、初回標本では悪性所見は全く見いだし得なかった

が deep cut で腺管の乱れが見られ、いわゆる異型上皮 (ATP) とは異なるが、異型度が低い Group III として報告されていた。今回の再検討時、面あわせ後の最初一枚で悪性所見が明らかになり、53 枚目では再び悪性所見が消失した。140 枚目から 209 枚目の間に再び悪性所見が見られるようになり、210 枚目になってこの悪性像は消失していた。一方、組織切片の大きさは、初回 $0.3 \times 1 \text{ mm}$, deep cut $0.5 \times 1.5 \text{ mm}$ であったが、連続切片 1 枚目 $0.6 \times 1 \text{ mm}$, 53 枚目 $0.3 \times 0.8 \text{ mm}$, 140 枚目 $1.5 \times 1 \text{ mm}$, 193 枚目 $1 \times 1 \text{ mm}$, 210 枚目になると $1.2 \times 0.5 \text{ mm}$ と変化していた (Fig. 1)。初回, deep cut 時の組織像の読みをどう判断するかは問題があるとしても、さらに切り込んでいくと、明らかな悪性像があらわれてきた点には注意すべきであろう。また、切り込んでいくにつれ、標本は次第に小さくなり、当初みられた異型性が一度消失し、再び標本が大きくなると悪性像が現れてきた点も薄切切片作成法を考える上で重要な示唆を与える。なお本症例では、再検依頼をコメントに書いていたが、臨床的には癌の可能性が大きく、生検後 2 週間目に胃全摘術がなされ、腺癌であることが明らかにされている。

症例 2: 4 個の生検材料が提出され、1, 2, 4 番目の標本には著変がなく、3 番目の標本の壊死物質内に異型の細胞様集団を認めたが、deep cut しても、明らかな癌病巣は発見できず“要再検”として報告された。今回の 84 枚の連続切片標本では、3 番目の標本には全く悪性所見はみられなかった。しかし、4 番目の組織では初回切片・deep cut 時に悪性所見が全く見出されていないにもかかわらず、標本の 24 枚目から異型性のある小腺管が出現し、明らかな癌の像を示してきた。1, 2 番目の標本は 57 枚目で完全に消失している。この症例は、2 週間後に再度生検が施行され、その時点では Group V として報告されている。本症例の場合、大きさの違う標本

を数個同時に処理・包埋し、薄切すると、小さい標本を中心に仕事をすれば、大きな標本の切り込みが足りなくなる恐れがあることを示唆している。



薄切深度の違いによる組織切片の大きさの変化 (症例 1)

- a 初回切片
 - b deep cut 時の切片
 - c 連続切片による検討時最初の切片
 - d 53枚目の切片
 - e 140枚目の切片
 - f 193枚目の切片
- いずれも同倍率 ($\times 20$) で撮ってある

Fig. 1. Variation in the size of the tissue section according to the depth of sectioning.

- a. Initial cut.
- b. A section at the deep cut.
- c. The first of the serially cut sections.
- d. The 53rd section.
- e. The 140th section.
- f. The 193rd section.

All are photographed under the same magnification ($\times 20$).

症例 3: 8 個の組織片からなり、1 番目の組織片に異型の腺管の横断面が 3 つみられ、Group III として報告された (Fig. 2). 連続切片標本では、初めから 1, 2, 3 番目 (2×1.8 mm, 2×1 mm, 2×1 mm) の組織の切片の約半分までを占める 明らかな病巣が検出された



症例 3. 初回切片にみられた異型腺管

Fig. 2. Case 3. Atypical glands at the initial cut.

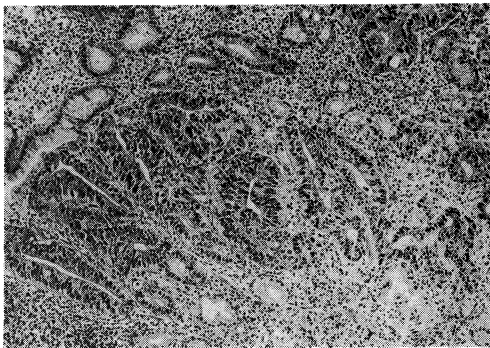


図 2 と同一症例 (症例 3) 連続切片 1 枚目に見られた多数の異型腺管

Fig. 3. Same as Fig. 2. (Case 3). Numerous atypical glands in the first of the serially cut sections.

(Fig. 3). 10 枚目の切片では、標本の大きさに変化はないにもかかわらず、3 番目の病巣は消え、28 枚目の切片からは 5 番目の壊死組織内に数十個の癌細胞巣が出現し、さらに 31 枚目からは 4 番目の壊死組織にも同様の細胞がみられ、36 枚目では消失した。この 1, 2 番目の切片はこの切込み時には 1 mm 大の大きさになっていたが、依然癌巣を含んでいた。56 枚目で

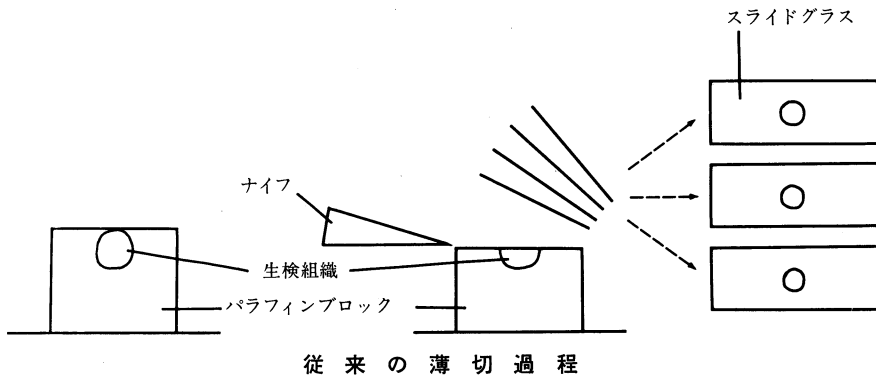
5 番目の標本の病巣は消失し、60 枚目で 1 番、2 番目の病巣も消失した。65 枚目で 3 番目の組織片に異型上皮が再び出現し、109 枚目までみられ、117 枚目では全組織が消失した。5 日後、再度生検が行われ、3 つの組織片で明らかな癌巣が認められている。

II 生検材料の特殊染色利用の頻度

再検討した 1421 症例中、特殊染色が利用されていたのは 39 症例、2.7%であった。利用した染色法は PAS, Mucicarmine, Pap 鍍銀法が、その主なものであった。特染の利用は、結果的には、陽性例の確認として要求されるよりは、むしろ陰性を確認するための補助をする場合が多く、また lymphoma と未分化癌との鑑別に際しても、H・E 染色標本以上の診断的役割を果たしたと考えられる症例には接していない。

考 案

病理部へ提出された臓器、組織の検査で最も重要なことは、まず肉眼的所見の把握と、そこからの標本採取であることに異論はない。これが Sampling error (標本摘出不良による誤診) を少なくする第一歩といえる。しかし、微小癌の如き小さな病変を正確に調べるためには、ほとんどすべての臓器や提出組織を組織学的に検索せねばならないが^{13), 14)}、日常検査にはとても応用できない。そこで多くの割面を肉眼的にたんねんに検索し、一番疑わしい場所を組織学的に検索するのが唯一これを補う方法として用いられている。しかし、組織学的検査に提出した標本に関しても Sampling error の問題が依然として残ることはすでに別報として指摘した通りである¹⁵⁾。たかだか 3~4 mm 大の鉗子生検材料では病理医は内視鏡による観察、標本採取に関与せず、この過程はほとんど臨床医によってなされている。しかし、この場合も同様に、薄切過程で同じような Sampling error が起こり得るものとみなし得る。この Sampling error を最小限とし、かつ技師の時間的、肉体的負担を軽減し、経済的負担をも少なくする妥



従来 の 薄 切 過 程
Fig. 4. Ordinary process of sectioning.

当な検査法を考えようというのが本報告の目的である。今回の検討から得られた結果をもとにして一般的薄切法の実際を改めて見直し、ついで理論的に妥当といえる薄切方法を文献的に考察し、それが日常検査に如何に応用が可能であるかを考え、鉗子生検材料検査の指針としてみたいと思う。

I 一般的薄切法に関する問題点

序言で述べた如く一般的な生検材料の処理過程は、無作為に荒削りした block から最終的に数枚の薄切切片を得、スライドグラス上にはりつけ鏡検する (Fig. 4)。この方法では、例えば $4\mu\text{m}$ の切片を連続で 20 枚検索するようにしたとしても単純に考えれば $3\sim 4\text{mm}$ 大の標本のうちの $80\mu\text{m}$ (0.08mm)、つまり $2\sim 3\%$ の部分しか検索していないことになる。しかも提出標本を球状に近い形とみなした場合には、標本を得る面により検索面積は異なり中心部の切片が一番面積が大きくなるのは当然である。今回の検討例のうち、症例 1 はまさにこの腫瘍の占める大きさに対する検索領域の問題であったと言える。一方、同一の block 内に数個の大きさの異なる組織片を包埋し薄切する場合 (Fig. 5)、最小の組織片にあわせて全提出標本が一枚のスライドグラスの上に乗るようになるのは、検査技師の心情として当然であるかもしれない。この場合、標本が球形であれば大きな組織片の検索面積が減ることになる。症例 2 は前述の問題点と共にこの問題をも提起した例と

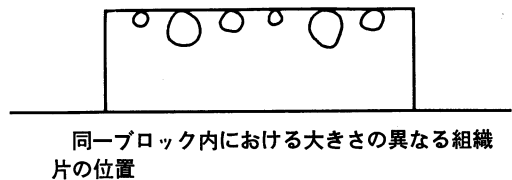


Fig. 5. The location of tissue masses with varied sizes within the same paraffin block.

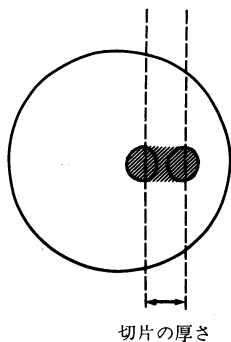
みなされる。これらの問題点は従来病理医の勘に頼って、deep cut の繰り返し、あるいは step cut を多数得るなどの方法で解決しようとしていたわけである。今回のように、病巣があらわれたり消えたりすることからして、すべての生検材料を全部連続切片で検索すべきであるのかという実際上の問題がでてくる。

今回の検索方法で真の見落とし率 (Sampling error; false negativity) が明らかにできたとは考えていない。臨床的には癌を疑わずに生検をした症例を加え全胃生検例を母集団にとれば、もちろん偽陰性率はさらに減少するであろう。一方逆に、臨床的に陰性として生検しながら組織検査で、しかも deep cut のみで陽性とされる逆の例の出現する可能性もあり得るわけである。いずれにしろ、今回の母集団数の少ない偽陰性率 7.3% は決して高い値とはいえず、全体の偽陰性率はきわめて低いものと推測される。すべての生検材料を連続切片で検査するのは、日常検査では種々の理由より不可能であり、たとえ、できたとしても、以上の理由から

無駄が多いと考えられる。また、観察者による見落としも逆に問題になってくる。50枚以上の連続切片スライドを短時間に見ると見落としが多くなる、とはある経験者の言葉であることを附記せねばならない。

II 癌検出に関する理論的方法の文献的考察

球形の組織片内にある特定の大きさの病変を検出する確率に関しては、Wilkinson & Hanse¹⁰⁾の研究がある。彼らは廓清されたリンパ節への癌転移の検出率を念頭において、コンピューターを使用して数学的に考察した。検出率は病変の大きさ、切片の厚さに左右されるが、ともかくも、その一部だけでもとらえるこ



1枚の薄切切片で得られる
病変検出範囲

Fig. 6. The range of detection in one cut.

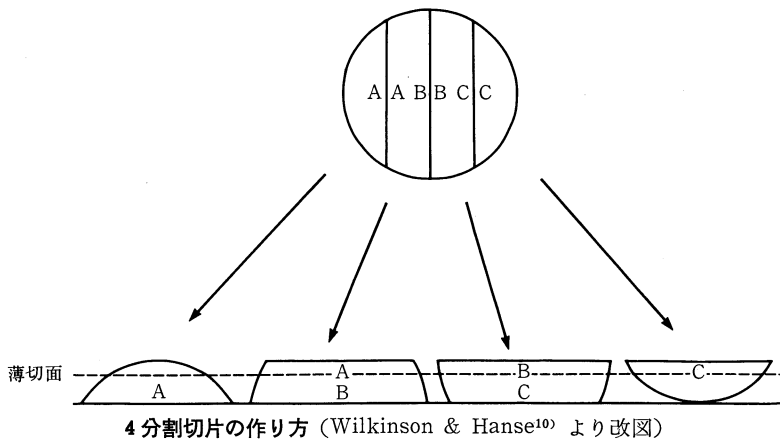
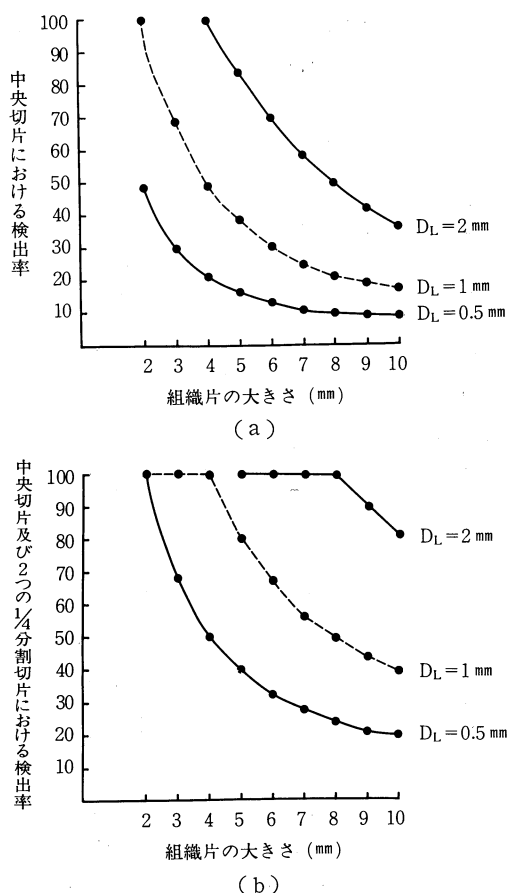


Fig. 7. Principle of four sectioning.

(Modified from that of Wilkinson and Hanse¹⁰⁾.)

とができればよいわけであるから、実際に検出できる割合は Fig. 6 のように拡がってくる。彼らは組織片 (または切片) の取り方を Fig. 7 のように中央部切片、2つの1/4分割切片、表層切片の4つにわけて、無作為に存在する病変の検出率を計算した。これをやや改変したのが Fig. 8 である。Fig. 8. a, b はそれぞれ中央部切片のみ、中央部切片2つの1/4分割切片による検出率が組織片の大きさ、病巣の大きさによって如何に変わるかを示している。リンパ節への癌転移の特徴は、まずリンパ行性に被膜下辺縁洞に起こる点で、これを考慮に入れた確率計算は、一般的な癌の検出の場合とは一致しない。しかし、Fig. 8で求めた検出率はそのまま鉗子生検されたほぼ球形の材料に充分あてはめて考えることができる。また、多角形のものや変形した材料における検出率は、その最長径から推定した球形の材料におけるそれよりも、高くなるはずである。いずれにせよ、球形の組織片を想定した場合、中央部切片のみでは、直径4mmほどの生検材料中の1mm径の癌病巣は少なくとも50%の確率で検出が可能であり、中央部切片、2つの1/4分割切片では、ほぼ100%検出することができる。従って、彼らの計算によれば、4分割表面の検索が理想的と言えるわけである。

この理論を本報告の3症例にあてはめると、初回検索で切られた部分が組織片の1/4、または1/3と仮定した場合、いかなる部分から薄切が開始されたとしても、その1/4、中央、3/4のいずれかの切片で癌を検出することができるのがわかる。



中央切片のみ (a), 中央切片及び2つの1/4分割切片 (b), における検出率と組織片, 病変の大きさ (DL) の関係 (Wilkinson & Hanse¹⁰⁾ より)

Fig. 8. Relation between detection rate and size of tissue block and lesion.
a) Central section only.
b) Central and two quarter sections.
(Modified from that of Wilkinson and Hanse¹⁰⁾.)

III 日常検査への応用

廓清されたリンパ節と違って胃癌材料等のように内視鏡下で得られる材料は, 直視下で病変をある程度まで選択的に採取することができるため, 理論的には検出の可能性はより高く, 場合によってはそのすべてが癌であることもあり得る. しかし, 今回の3例の検討からは, 選択的に得られたと思われる材料内にも, 病変の占める割合・分散状態にかなりばらつきがあり,

無作為の表層1/4分割切片のみでは偽陰性の可能性がかなり残り得ることを示唆している. Wilkinson & Hanse¹⁰⁾ の例で考察された理想的と考えられる4分割切片法をそのまま3~4 mm大までの小さな生検材料を対象にあてはめることは不可能である. しかし, この問題はブロックづけされた生検材料をstep cutして, 中央, 1/4分割切片に相当するものを取り出すことにより解決できると考えられた. この場合, 間の切片をそのまま捨て去るか, 未染色のままスライドグラスにはって残しておくべきなのかが問題になる. ここで特殊染色利用率は2.7%であり, その有用性は低いものと考えられたことを再認識すべきであろう. また, 胃癌生検材料では, 癌病巣の組織学的確認が第一の目的であることを忘れてはならない.

次に, 多数の組織片を1つのブロックに包埋し, 薄切する方法について考察してみよう. 多くの検査室でこの方法を採用しているのは, 技師にかかる時間的, 労力的負担, 使用材料に要する費用, ブロック保存等の面で省力化をはかろうとする理由からである. この方法が今まで述べてきた検出率向上のための4分割切片法に, どの様に影響するであろうか. 鉗子生検材料では, 組織片の大きさがほぼ4 mm以下という条件が加わるので, たとえ多組織が入っている場合でも, 最大径を4 mmと考えると, 他のもはそれ以下ということになり, 組織片が小さくなればなるだけ少ない切片数で, 1 mm大の病巣を検出する可能性がより高くなる. これは Fig. 8 の a, b を比較すれば明らかであろう. 例えば, 2 mm大の組織片から中央部切片1枚のみで, 1 mm大の大きさの病巣を100%検出することが可能である. 従って, 多組織を包埋した場合にも, 原則として4分割切片法を利用することができると考えられる. つまり, 最大径の組織を中心に本法を利用し, 他組織がその4分割のいずれかに入る様にしておけば, すべての組織において癌検出率が高くなるはずである.

以上のことから, 臨床的に癌が疑われている

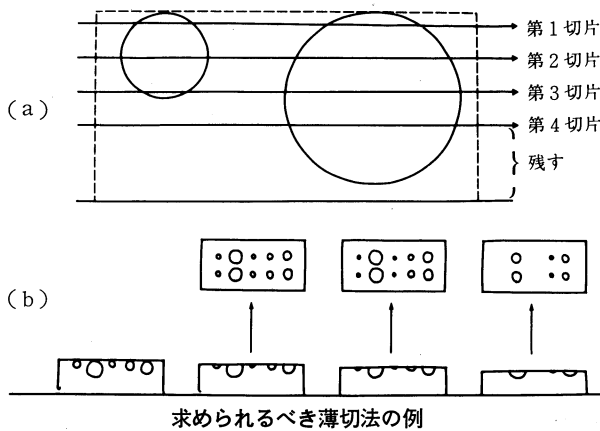


Fig. 9. Example of the recommended sectioning.

場合は、4分割切片に近いものを2~3枚ずつ作るようにし、その間の組織片は捨て去り、多数の組織片が同時に包埋されている場合には、最後の3/4分割目相当の切片を、一番大きな組織片の厚さの半分以下の深さにまで切り込む (Fig. 9. a, b)。また、1つの組織片が小さいときは、少なくとも1分割切片上にするのが良いと考えられた。従って、薄切時に組織片の大きさを認識しつつ、上述の様に包埋、薄切する必要がある。

最後に、技師の側からみて、4分割切片を得るのに、それほど時間的、労力的負担がかからないことを強調しておきたい。

IV その他の生検材料の場合

鉗子生検材料では3~4mm大の中から、最小

あ と が き

本検討後、胃鉗子生検材料に対しては、一検体のみ、多検体のものにかかわらず4分割切片法で検索する様にしているが、この一年弱で、1, 2番目の切片では癌がなくとも3番目の深さの切片で癌が検出できた症例が著者らの知る限りで5例もあり、本法の重要性を再確認した事をつけ加えておきたい。

文 献

- 1) Kellow, W. F., Cotsonas, N. J., Chomet, B. and Zimmerman, H. J.: Evaluation of the adequacy of needle biopsy specimens of the kidney: An autopsy study. Arch. intern. Med. 104: 353-359, 1959
- 2) Nichols, T. M., Boyes, D. A. and Fidler, H. K.: Advantages of routine step serial sectioning of cervical cone biopsies. Am. J. clin. Pathol. 49: 342-346, 1968
- 3) 小黒八七郎: 胃癌と内視鏡検査. 東京, 羊工社. 1980, pp. 201-231
- 4) 広田映五, 板橋正幸 ほか: 胃生検組織病理診断の信頼性. 治療 64: 317-327, 1982
- 5) 武藤徹一郎: 大腸ポリープその病理と臨床. 東京, 南江堂. 1979

1 mm 大位までの癌巣を検出するのに有効な薄切方法について考察してきたが、本法をそのままその他の目的で生検された他の材料にあてはめてよいかどうかという問題が残っている。経気管支的肺生検 (transbronchial lung biopsy; TBLB) を例としてみると、1~2 mm 大の granuloma を検出するには同じ方法でよい様に考えがちである。しかし、肺粘膜下肺実質組織の採取を目的とした TBLB の場合は、(1) 検出率、臨床診断の正確さが胃癌のそれに劣る。(2) 特殊染色を利用す

る頻度が高い。(3) 多くの切片を観察する必要がある場合が多いなどの点から、同様に扱うには検討を要する。肺生検の場合には、初めに少なくとも3枚のH・E染色を観察し、必要に応じて deep cut, step cut, 中央1/4分割切片、特殊染色等を加えていくようにせざるを得ない。この問題に関しては、今後さらに詳細な検討を要すると考えている。

ともあれ、生検材料の薄切方法は採取部位、推定される疾患によってそれぞれ変えていかねばならない。なお一層の病理医、技師間の協力が必要であることを、お互いが認識しなければならないと思う。

- 6) Cooper, T. P., Wheelis, R. F., Correa, R. A., Jr. et al.: Random mucosal biopsies in the evaluation of patients with carcinoma of the bladder. *J. Urol.* 117: 46—48, 1977
- 7) Andersen, H. A.: Transbronchoscopic lung biopsy for diffuse pulmonary diseases. *Chest* 73: 734—736, 1978
- 8) Clark, R. A., Gray, P. B., Townshend, R. H. and Howard, P.: Transbronchial lung biopsy: A review of 85 cases. *Thorax* 32: 546—549, 1977
- 9) Hanson, R. R., Zavala, D. C., Rhodes, M. L. et al.: Transbronchial biopsy via flexible fibroptic bronchoscope: Results in 164 patients. *Am. Rev. resp. Dis.* 114: 67—72, 1976
- 10) Wilkinson, E. J. and Hanse, L.: Probability in lymph node sectioning. *Cancer* 33: 1269—1274, 1974
- 11) Kennedy, A.: Basic techniques in diagnostic histopathology. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1977
- 12) Underwood, J. C. E.: Macroscopy, microscopy and sampling. In "Introduction to biopsy interpretation and surgical pathology." Berlin, Springer-Verlag, 1981
- 13) Silverberg, S. G. and Vidone, R. A.: Carcinoma of the thyroid in surgical and post-mortem material. Analysis of 300 cases at autopsy and literature review. *Ann. Surg.* 164: 291—299, 1966
- 14) Franks, L. M.: Latent carcinoma of the prostate. *J. Pathol. Bacteriol.* 68: 603—616, 1954
- 15) 真鍋俊明, 津嘉山朝達, 山下貢司: 術中迅速外科標本: 本学における過去3年間の利用度とその正確さ及び限界. *川崎医学会誌* 8: 56—64, 1982