

甲状腺腫瘍の細胞診と遺伝子異常の研究

新潟大学大学院保健学研究科博士後期課程保健学専攻検査技術科学分野

B17C501H 林 真也

(指導：岩淵 三哉教授)

Study of cytology and genetic abnormalities in thyroid tumors

Shinya Hayashi

Division of Medical Technology, Graduate School of Health Sciences,
Niigata University, Niigata, Japan
(Directed by Prof. Mitsuya Iwafuchi)

要旨

【背景】

甲状腺穿刺吸引細胞診は患者への侵襲性が少ないことから、結節性病変や一部のびまん性甲状腺腫の診断確定のために用いられる。穿刺吸引細胞診の判定結果によって治療方針が決定されることが多く、良悪性の判定および組織型の推定が重要となる。

【目的】

甲状腺穿刺吸引細胞診において適正な判定や精度の向上を目的に以下の検討を行った。

1. 濾胞性腫瘍の細胞学的所見
 - I. 濾胞性腫瘍の判定基準の見直し
 - II. 鑑別困難例の再判定
 - III. 濾胞性腫瘍判定基準変更後の推移
 - IV. 甲状腺癌取扱い規約（第7版）新報告様式への適応
2. 甲状腺穿刺吸引細胞診における乳頭癌症例の問題点
3. 甲状腺穿刺吸引細胞診における液状化検体細胞診の有用性
4. 甲状腺腫瘍における遺伝子検査の有用性

【結果・考察】

1. 濾胞性腫瘍の細胞学的所見

濾胞腺腫・濾胞癌の判定に重要な細胞所見があった。また、濾胞腺腫・濾胞癌は否定的で正常あるいは良性との判定が可能な細胞所見があり、鑑別困難例の相当数が正常あるいは良性に判定できた。

濾胞性腫瘍の判定基準の見直しを行い、再判定を行った検体では鑑別困難の比率が9.3%となり、濾胞性腫瘍の判定基準変更後は鑑別困難の比率が11.1%と推移していた。鑑別困難の比率を数値目標である20%以下とすることが可能であった。

濾胞性腫瘍の判定基準の見直しは甲状腺癌取扱い規約（第7版）の

新報告様式にも対応することが可能であり、再判定を行った検体では意義不明 5.9%、濾胞性腫瘍 3.4%、判定基準変更後は意義不明 5.9%、濾胞性腫瘍 5.2%となり、意義不明、濾胞性腫瘍ともに数値目標である 10%以下であった。

2. 甲状腺穿刺吸引細胞診における乳頭癌症例の問題点

乳頭癌の嚢胞内での変化や乳頭癌の特殊型（濾胞構造主体の乳頭癌、びまん性硬化型乳頭癌、好酸性細胞型乳頭癌）の症例において過小評価されていた。通常型とは異なる乳頭癌の細胞所見を把握し、過小評価とならないよう細胞診判定を行うことが重要である。また、検体の中には検体採取～標本作製の過程に問題があった可能性があることから、異型細胞を十分に採取・標本化できるよう検体採取～標本作製についても検討していくことが必要と考える。

3. 甲状腺穿刺吸引細胞診における液状化検体細胞診の有用性

不適正の比率が直接塗抹法では 27.9%であったが、LBC 法では 6.8%となり、LBC 法では不適正の検体が大幅に減少した。また、LBC 法では濾胞性腫瘍と判定した検体や悪性と判定した検体が増加した。LBC 法は多数の濾胞上皮細胞を得ることができ、観察が容易な標本が作製可能であり、細胞診判定の精度向上に寄与する。LBC 法よりも直接塗抹法が細胞診判定に適していた検体が少なからず存在したことから、LBC 法は単独で使用するよりも直接塗抹法と併用し細胞診判定を行うことが有用である。

4. 甲状腺腫瘍における遺伝子検査の有用性

乳頭癌では 15 例中 12 例に *BRAF* 変異 V600E、1 例に *RET/PTC1* 再構成を認め、高頻度に遺伝子異常を有する。

濾胞癌では 15 例中 9 例に *RAS* 変異 (*NRAS* Q61R : 3 例、*NRAS* Q61K : 2 例、*KRAS* Q61R : 2 例、*HRAS* Q61R : 2 例)、1 例に *PAX8/PPAR* γ 再構成を認めた。遺伝子異常を認めた 10 例は悪性度の高いグループ (widely invasive、encapsulated angioinvasive) に属していた。

濾胞腺腫、腺腫様甲状腺腫では遺伝子異常は検出されなかった。

甲状腺腫瘍において、*BRAF* 変異、*RAS* 変異、*RET* 再構成、*PAX8/PPAR*

γ再構成は組織型に特異性の高い遺伝子異常である。甲状腺腫瘍においてこれらの遺伝子検査を行うことは形態診断の困難な症例に有用な情報をもたらし、診断精度の向上に寄与する。

【結論】

甲状腺領域において穿刺吸引細胞診の判定結果は治療開始等に影響を及ぼす。患者の中には長期にわたり確定診断にいたらず、診療上問題が生じるため甲状腺穿刺吸引細胞診が複数回行われることがある。患者に多くの負担をかけることを避けるためにも細胞診の適正な判定や精度の向上が必要である。今回、濾胞性腫瘍の判定基準を変更したこと、甲状腺癌で最も多い乳頭癌を細胞診で悪性と判定できなかった原因を追究したことにより、甲状腺穿刺吸引細胞診の適正な判定や精度の向上に寄与できた。

また、LBC法の導入により細胞所見を追加することができ、細胞診の不適正率の低下および判定精度の向上ができる。遺伝子検査の追加は形態学とは異なる側面から有用な情報をもたらすことができる。

LBC法の導入や遺伝子検査の追加といった新たなツールを使用することは、甲状腺穿刺吸引細胞診の適正な判定や精度の向上につながる。

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 濾胞性腫瘍の細胞学的所見	2
2.1 背景	2
2.2 目的	3
2.3 方法	3
2.3.1 濾胞性腫瘍の判定基準の見直し	3
2.3.2 鑑別困難例の再判定	4
2.3.3 濾胞性腫瘍判定基準変更後の推移	4
2.3.4 甲状腺癌取扱い規約（第 7 版）新報告様式への適応	4
2.4 結果	4
2.4.1 濾胞性腫瘍の判定基準の見直し	4
2.4.2 鑑別困難例の再判定	6
2.4.3 濾胞性腫瘍判定基準変更後の推移	6
2.4.4 甲状腺癌取扱い規約（第 7 版）新報告様式への適応	6
2.5 考察	7
第 3 章 甲状腺穿刺吸引細胞診における乳頭癌症例の問題点	9
3.1 背景	9
3.2 目的	9
3.3 方法	10
3.4 結果	10
3.5 考察	10
第 4 章 甲状腺穿刺吸引細胞診における液状化検体細胞診（LBC）の 有用性	13
4.1 背景	13
4.2 目的	13
4.3 方法	13

4.4 結果	14
4.5 考察	14
第 5 章 甲状腺腫瘍における遺伝子検査の有用性	17
5.1 背景	17
5.2 目的	18
5.3 方法	18
5.3.1 患者と組織検体	18
5.3.2 Deoxyribonucleic acid (DNA)・Ribonucleic acid (RNA) 抽出	18
5.3.3 <i>BRAF</i> 変異・ <i>RAS</i> 変異の検出	18
5.3.4 <i>RET</i> 再構成・ <i>PAX8/PPAR</i> γ 再構成の検出	21
5.4 結果	22
5.4.1 核酸品質	22
5.4.2 遺伝子解析結果	22
5.5 考察	23
第 6 章 結論	26
引用文献	28
図表	33

第 1 章

緒論

甲状腺穿刺吸引細胞診は患者への侵襲性が少ないことから、結節性病変や一部のびまん性甲状腺腫の診断確定のために用いられる。穿刺吸引細胞診の判定結果によって治療方針が決定されることが多く、良悪性の判定および組織型の推定が重要となる。

甲状腺穿刺吸引細胞診の適正な判定や精度の向上を図るため、甲状腺癌取り扱い規約では各判定区分に数値目標を設定している。

これらの背景から、本研究では甲状腺穿刺吸引細胞診における濾胞性腫瘍や乳頭癌の細胞所見、診断確定を向上するためのツール（液状化検体細胞診や遺伝子検査）について確認するために、以下の 4 点の検討を行った。

1. 濾胞性腫瘍の細胞学的所見
2. 甲状腺穿刺吸引細胞診における乳頭癌症例の問題点
3. 甲状腺穿刺吸引細胞診における液状化検体細胞診の有用性
4. 甲状腺腫瘍における遺伝子検査の有用性

本研究は、甲状腺穿刺吸引細胞診において適正な判定や精度の向上に寄与すると考える。

第 2 章

濾胞性腫瘍の細胞学的所見

2.1 背景

甲状腺癌取扱い規約（第 6 版）¹⁾では、甲状腺穿刺吸引細胞診の判定区分が検体不適正、正常あるいは良性、鑑別困難、悪性の疑い、悪性の 5 群に分類されている。数値目標として、検体不適正の占める割合は細胞診検査総数の 10%以下、鑑別困難の占める割合は検体適正症例の 20%以下が望ましいとされており、悪性の疑いと判定した検体については、その後の組織学的検索で総数の 80%以上が悪性であることが望ましいと記載されている。さらに、注意事項として、検体不適正が 10%を超える場合は採取方法、標本作製法について検討が必要とされており、鑑別困難における 20%あるいは悪性の疑いにおける 80%の数値から明らかに逸脱するときは細胞診断に関する検討が必要であると記載されている。

甲状腺癌取扱い規約（第 6 版）に沿って判定された 2006～2013 年の 2275 検体を検索したところ、検体不適正：11.3%（258 検体）、鑑別困難：47.7%（963 検体）であった（表 1）。悪性の疑い 36 検体の中で、22 検体にて組織学的検索が行われており、90.9%（20 検体）が悪性と診断されていた。悪性の疑いについては問題なかったが、検体不適正と鑑別困難については数値目標を超えていた。

鑑別困難が多い理由は、非腫瘍性の腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）、良性腫瘍の濾胞腺腫、悪性腫瘍の濾胞癌が個々の細胞所見では区別できないためである（図 1）。組織診断では被膜の有無や被膜を超える浸潤、脈管侵襲、甲状腺外への転移等が診断基準となるため、細胞診では組織診断の診断基準が適用できない（図 2）。そのため、新潟県立中央病院では濾胞腺腫、濾胞癌に腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）を含めて濾胞性腫瘍としていたため、多くの細胞診検体が鑑別困難（推定病

変：濾胞性腫瘍）と判定され、判定比率が 47.7%となっていた。

しかし、数値目標である 20%をはるかに超える数値であり、鑑別困難と判定された 963 検体中 870 検体が濾胞性腫瘍を推定していたこと、鑑別困難（推定病変：濾胞性腫瘍）と判定後、組織学的検索が行われた症例の多くは腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）であったことから、新潟県立中央病院での濾胞性腫瘍の定義を変更し、判定基準を改善する必要があると考えられた。

また、2015 年に改訂された甲状腺癌取扱い規約（第 7 版）²⁾では報告様式が変更となり、判定区分は検体不適正、嚢胞液、良性、意義不明、濾胞性腫瘍、悪性の疑い、悪性の 7 区分に分類されている。新報告様式では鑑別困難を意義不明と濾胞性腫瘍に分類する必要があることから、濾胞性腫瘍の細胞所見を把握することがさらに重要となっている。

2.2 目的

濾胞性腫瘍の判定基準の見直しを行い、甲状腺穿刺吸引細胞診判定の適正化を目的に検討を行った。また、甲状腺癌取扱い規約（第 7 版）の報告様式への適応についても検討を行った。

2.3 方法

2.3.1 濾胞性腫瘍の判定基準の見直し

2003～2013 年*に新潟県立中央病院にて甲状腺穿刺吸引細胞診を施行し、鑑別困難（推定病変：濾胞性腫瘍）と判定後、組織学的に濾胞腺腫または濾胞癌と診断された 19 症例 36 検体について細胞所見をまとめ、2006～2013 年に甲状腺穿刺吸引細胞診にて鑑別困難（推定病変：濾胞性腫瘍）と判定され、組織学的に腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）と診断された 57 症例 69 検体と比較検討を行い、文献等¹⁾⁻⁷⁾を参考に濾胞性腫瘍の判定基準の変更を行った。

*濾胞腺腫、濾胞癌症例少数のため 2003～2005 年を追加した。

2.3.2 鑑別困難例の再判定

2006～2013 年に新潟県立中央病院にて甲状腺穿刺吸引細胞診が施行された 2275 検体中、鑑別困難と判定された 963 検体について、変更した判定基準を用いて再判定を行った。再判定においても鑑別困難とした検体については、意義不明・良性病変疑い、良悪性鑑別困難、濾胞性腫瘍疑い・濾胞性腫瘍の 3 つに細分類した。採取細胞量が少数で濾胞性腫瘍の可能性のある検体または良性病変を疑うが異型を有する検体は意義不明・良性病変疑い、乳頭癌や悪性リンパ腫等悪性病変（濾胞性腫瘍を除く）の可能性のある検体は良悪性鑑別困難、採取細胞量が十分あり、濾胞腺腫・濾胞癌の細胞所見を有する傾向にある検体は濾胞性腫瘍疑い・濾胞性腫瘍とした。

2.3.3 濾胞性腫瘍判定基準変更後の推移

濾胞性腫瘍の判定基準を変更後に甲状腺穿刺吸引細胞診が施行された 332 検体（2014 年 4 月～2016 年 11 月）について細胞診判定の推移を調査した。

2.3.4 甲状腺癌取扱い規約（第 7 版）新報告様式への適応

甲状腺癌取扱い規約（第 7 版）の新報告様式への適応については、2006～2013 年の再判定結果および判定基準変更後（2014 年 4 月～2016 年 11 月）の判定結果をもとに、鑑別困難を意義不明と濾胞性腫瘍に分類し、意義不明と濾胞性腫瘍の判定比率の検証を行った。

2.4 結果

2.4.1 濾胞性腫瘍の判定基準の見直し

濾胞腺腫・濾胞癌（好酸性細胞型を除く）の細胞所見は以下のような傾向であった（表 2、図 3）。

- (1) 核の立体的な腫大（小型リンパ球の直径 2 倍以上あり）
- (2) 不規則な重積性（3 層以上の重なり）
- (3) 核間距離不均等（核が重なり、核間距離の狭い部分あり）
- (4) 結合性の低下（構造は保持されているが、ほつれ等あり）
- (5) 多彩性なし（同一細胞から構成）
- (6) 細胞量多い
- (7) 嚢胞所見なし

好酸性細胞型濾胞腺腫・濾胞癌では、核の腫大や不規則な重積性が軽度、核間距離が広い、嚢胞所見ありの症例が多く存在し、同様の傾向ではなかったが、(4) 結合性の低下、(5) 多彩性なしが特徴的な所見であった（表 2、図 4）。

腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）症例との比較から、濾胞腺腫・濾胞癌（好酸性細胞型を除く）では(1)～(4)、好酸性細胞型濾胞腺腫・濾胞癌では(4)、(5)が濾胞性腫瘍として重要な細胞所見であった。

腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）の中には、濾胞腺腫・濾胞癌と同様の細胞所見を呈する症例があり、両者を完全に区別することはできないが、濾胞腺腫・濾胞癌は否定的で正常あるいは良性との判定が可能な細胞所見があり、組織学的に腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）と診断された 69 検体中 50 検体を正常あるいは良性と判定することが可能であった。正常あるいは良性と判定可能な細胞所見は以下の項目であった（表 2、図 5）。

- (a) 核の大きさが小型リンパ球の 2 倍に満たない細胞が主体
- (b) 平面的（3 層を超えない）な集塊または規則的な配列を示す濾胞構造集塊
- (c) 核間距離が均等（広い～核が少し重なる程度）
- (d) 結合性が強固
- (e) 多彩性（好酸性細胞の混在）

2.4.2 鑑別困難例の再判定

濾胞性腫瘍の判定基準を変更し、2006年～2013年に鑑別困難と判定された963検体について再判定を行った結果は、不適正：3検体、正常あるいは良性：773検体、鑑別困難：187検体であった。鑑別困難を3つに細分類すると、意義不明・良性病変疑い：83検体、良悪性鑑別困難：35検体、濾胞性腫瘍疑い・濾胞性腫瘍：69検体であった（表3）。鑑別困難が963検体から187検体に減少し、鑑別困難の判定比率は9.3%となった（表4）。963検体中で組織学的に濾胞腺腫、濾胞癌と診断された症例の検体は8検体で、すべて鑑別困難（意義不明・良性病変疑い：2検体、良悪性鑑別困難：1検体、濾胞性腫瘍疑い・濾胞性腫瘍：5検体）であった（表5）。

2.4.3 濾胞性腫瘍判定基準変更後の推移

2014年4月～2016年11月に甲状腺穿刺吸引細胞診が施行された332検体の判定結果は、検体不適正：43検体（13.0%）、正常あるいは良性：233検体（80.6%）、鑑別困難：32検体（11.1%）、悪性の疑い：4検体（1.4%）、悪性：20検体（6.9%）であった（表6）。甲状腺穿刺吸引細胞診施行後に組織学的検索が行われた症例は38例あり、細胞診断と組織診断の比較を表7に示す。腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）と診断された12例中10例は正常あるいは良性と判定されていた。濾胞腺腫の1例が正常あるいは良性と判定されていた。

2.4.4 甲状腺癌取扱い規約（第7版）新報告様式への適応

甲状腺癌取扱い規約（第7版）の新報告様式への適応については、2006年～2013年に鑑別困難と判定された963検体を再判定した際に鑑別困難を3つに細分類したことにより、意義不明・良性病変疑い、良悪性鑑別困難と判定した検体を意義不明に、濾胞性腫瘍疑い・濾胞性腫瘍と判定した検体を濾胞性腫瘍に分類することが可能であった。

2006～2013年の再判定結果では、意義不明：118検体（5.9%）、濾胞性腫瘍：69検体（3.4%）であった（表8）。判定基準変更後（2014

年4月～2016年11月)の判定結果では、意義不明：17検体(5.9%)、濾胞性腫瘍：15検体(5.2%)であった(表9)。

2.5 考察

濾胞腺腫・濾胞癌(好酸性細胞型は除く)の判定基準として、核の立体的な腫大、不規則な重積性や結合性の低下等構造異型が重要な細胞所見であった。好酸性細胞型濾胞腺腫・濾胞癌では結合性の低下(散在性細胞が多い)と多彩性なし(好酸性細胞で構成)が重要な細胞所見であった。また、濾胞腺腫・濾胞癌は否定的で正常あるいは良性との判定が可能な細胞所見があり、鑑別困難例の相当数が正常あるいは良性に判定できた。

濾胞性腫瘍の判定基準を変更することにより、2006年～2013年の検体では鑑別困難の比率が9.3%に減少し、2014年4月～2016年11月の検体では鑑別困難の比率が11.1%と推移していたことから、鑑別困難の比率を数値目標である20%以下とすることは可能であった。2006年～2013年に鑑別困難と判定された検体中、組織学的に濾胞腺腫、濾胞癌と診断された症例において、再判定にて正常あるいは良性とされた検体はなかった。2014年4月～2016年11月の検体中、穿刺吸引細胞診施行後に組織学的検索が行われた症例において、腺腫様結節(腺腫様甲状腺腫)と診断された症例の多くが正常あるいは良性と判定されていた。正常あるいは良性と判定されていた濾胞腺腫は腫瘍細胞が変性に陥っており、典型的な細胞像とは異なる所見であった(図6)。以上より変更した濾胞性腫瘍の判定基準は適正なものと考えられる。

甲状腺癌取扱い規約(第7版)の新報告様式に移行するには、今まで鑑別困難と判定された検体を意義不明または濾胞性腫瘍に分類することが必要となるが、鑑別困難例の再判定を行った際に、鑑別困難を3つに細分類したことにより鑑別困難と判定した理由が明確となっており、新報告様式にも対応することが可能であった。新報告様式では意義不明、濾胞性腫瘍ともに数値目標は10%以下とされているが、

2006～2013年の再判定結果では意義不明 5.9%、濾胞性腫瘍 3.4%、判定基準変更後（2014年4月～2016年11月）の判定結果では意義不明 5.9%、濾胞性腫瘍 5.2%となっており、変更した濾胞性腫瘍の判定基準は甲状腺癌取扱い規約（第7版）の新報告様式においても適応できる。

鑑別困難例の中には長期にわたり確定診断にいたらず、診療上問題が生じるため甲状腺穿刺吸引細胞診が複数回行われることがある。患者に多くの負担をかけることを避けるためにも鑑別困難を減少することは重要である。今回、濾胞性腫瘍の判定基準を変更したことにより、適正な判定や精度の向上に寄与できたものとする。

第 3 章

甲状腺穿刺吸引細胞診における乳頭癌症例の問題点

3.1 背景

甲状腺領域において穿刺吸引細胞診は患者への侵襲性が少ないことから広く普及しており、結節性病変や一部のびまん性甲状腺腫の診断確定のために用いられる。甲状腺穿刺吸引細胞診の判定結果によって治療方針が決定されることが多く、良悪の判定および組織型の推定が重要となる。

新潟県立中央病院では 2010～2015 年に 172 例の甲状腺手術が施行され、その内の 166 例（96.5%）が手術前に甲状腺穿刺吸引細胞診が施行されていた（表 10）。手術検体の組織学診断は乳頭癌：91 例、濾胞癌：3 例、低分化癌：3 例、未分化癌：2 例、悪性リンパ腫：3 例、濾胞腺腫：2 例、嚢胞変性を伴う濾胞性腫瘍：1 例、腺腫様結節（腺腫様甲状腺腫）：51 例、バセドウ病：12 例、甲状腺炎：2 例、悪性所見無し：2 例であった。悪性と診断された 102 例中 91 例（89.2%）が乳頭癌であった。乳頭癌症例の 85 例（93.4%）で手術前に甲状腺穿刺吸引細胞診が施行され、細胞診判定は不適正：3 例（3.5%）、正常あるいは良性：18 例（21.2%）、鑑別困難：7 例（8.2%）、悪性の疑い：13 例（15.3%）、悪性：44 例（51.8%）であった。悪性または悪性疑いと判定できなかった症例が 28 例（32.9%）あった（表 11）。

3.2 目的

甲状腺癌の約 90%を占める乳頭癌症例において新潟県立中央病院の甲状腺穿刺吸引細胞診に問題点がないか検討を行った。

3.3 方法

2010～2015年に新潟県立中央病院にて甲状腺の手術が施行され、手術前の甲状腺穿刺吸引細胞診にて悪性または悪性の疑いと判定できなかった乳頭癌症例28例を対象とし、細胞診標本の再鏡検および組織診断との比較を行った。

3.4 結果

鑑別困難と報告した7例中5例については、再鏡検において悪性または悪性の疑いの判定であり、過小評価された症例であった。残りの2例は異型細胞が出現していたが、ごく少数での出現であり、再鏡検でも鑑別困難の判定となった(表12)。

悪性または悪性の疑いと判定すべきであった5例の組織診断は通常型乳頭癌：3例、嚢胞形成を示す乳頭癌：1例(図7)、濾胞構造が主体であった乳頭癌：1例(図8)であった。

正常あるいは良性と判定した18例中4例については、再鏡検において異型細胞の出現を認め、鑑別困難以上に判定すべき症例であった(表13)。

異型細胞を認めた4例の組織診断は嚢胞形成を示す乳頭癌：2例、びまん性硬化型乳頭癌：1例(図9)、好酸性細胞型乳頭癌：1例(図10)であった。

不適正3例と正常あるいは良性14例には再鏡検においても異型細胞を認めなかったが、5例(不適正：1例、正常あるいは良性：4例)は再検査で悪性と判定されていた。6例の組織診断は偶発癌(乳頭癌)、3例は石灰化・硝子化が著明な乳頭癌であった。

3.5 考察

再鏡検にて過小評価と判断された症例が28例中9例(鑑別困難：5例、正常あるいは良性：4例)あった。その内6例は通常型乳頭癌と

は異なる細胞所見を呈していた。

嚢胞形成を示す乳頭癌の症例では、嚢胞内での変化が加わり変性した N/C 比の低い細胞が集塊で出現していた。組織球との鑑別を要する細胞を認めるが、嚢胞内に浮遊する乳頭癌細胞の所見であり、集塊内には核内細胞質封入体を有する細胞も認めた。また、嚢胞形成を示す乳頭癌に特徴的とされている隔壁性細胞質内空胞を有する細胞集塊が出現し、少数ではあるが乳頭状構造と推定される集塊や砂粒体を認めたことから、乳頭癌を疑うべき細胞所見であった。

濾胞構造が主体であった乳頭癌の症例では、多数の小濾胞構造が出現し、濾胞内にはコロイドを認め、濾胞性腫瘍が鑑別に挙がる所見であった。核溝や核内細胞質封入体が少数であったが、核はすりガラス状を呈し、1ヶ所に血管間質を有する乳頭状集塊を認めたことから、乳頭癌（濾胞構造主体）と判定すべき細胞所見であった。

びまん性硬化型乳頭癌の症例では、炎症細胞が多く、上皮細胞が少数であったが、扁平上皮化生細胞の小集塊を認めた。砂粒体が多数出現し、砂粒体を含有する扁平上皮化生細胞の小集塊も認めた。びまん性硬化型乳頭癌では核溝や核内細胞質封入体を認めることは少ないが、扁平上皮化生細胞や砂粒体の出現が特徴的な細胞所見であり、乳頭癌と判定すべき細胞所見であった。

好酸性細胞型乳頭癌の症例では、変性が高度で核所見が不明瞭であり、好酸性の細胞質を有していたが、円柱状の細胞がシート状～乳頭状集塊で多数出現し、乳頭癌が疑われる細胞所見であった。

過小評価と判断された原因として、乳頭癌細胞の嚢胞内での変化や乳頭癌の特殊型（濾胞型乳頭癌、大濾胞型乳頭癌、好酸性細胞型乳頭癌、びまん性硬化型乳頭癌、高細胞型乳頭癌、充実型乳頭癌、篩型乳頭癌、明細胞型乳頭癌、ワルチン腫瘍様乳頭癌など）の細胞所見を熟知していないことが考えられる。乳頭癌細胞の嚢胞内での変化や乳頭癌の特殊型の細胞所見は文献等で報告されており¹⁾⁻⁶⁾、甲状腺癌取扱い規約⁷⁾⁻⁸⁾や細胞診ガイドライン 3 甲状腺・内分泌・神経系⁹⁾に記載されており、細胞像も掲載されていることから、通常型と異なる乳頭

癌症例の細胞診判定も要求されている。

鑑別困難と判定された 2 例では異型細胞が少なく、不適正 3 例と 14 例では異型細胞を認めなかったことから、検体採取～標本作製の過程において問題があった可能性がある。不適正と正常あるいは良性症例のうち 6 例は偶発癌（乳頭癌）、3 例は石灰化・硝子化が著明な乳頭癌であったことから、検体採取が難しい症例であったために異型細胞が採取できなかった可能性があるが、5 例（不適正 1 例、正常あるいは良性 4 例）では再検査で悪性と判断されていることから、検体採取において超音波所見を把握し適切に検体が採取されているか確認することや標本作製過程において採取細胞の剥離が少ない方法に変更することなど、異型細胞を十分に採取・標本化できるよう検体採取～標本作製についても検討していくことが必要と考える。

甲状腺領域において穿刺吸引細胞診の判定結果は治療開始等に影響を及ぼすことから、乳頭癌の嚢胞内での変化や特殊型の細胞所見を把握し、過小評価とならないよう判定することや最適な細胞診判定が可能な検体採取～標本作製を行うことが重要である。

第 4 章

甲状腺穿刺吸引細胞診における 液状化検体細胞診（LBC）の有用性

4.1 背景

液状化検体細胞診（liquid-based cytology：LBC）は、1990年代から米国を中心に婦人科領域で使用されてきたが、近年では婦人科以外の検体にも使用されるようになった。甲状腺穿刺吸引細胞診においても有用性が報告されており^{1)・4)}、Thyroid Bethesda Systemのアトラスには、LBCの細胞像が多数掲載されている⁵⁾。今後、甲状腺でもLBCが広く普及していくことが予想される。新潟県立がんセンター新潟病院では2013年8月よりオートスメア法による標本作製を中止し、LBC（TACAS™）を導入した。

4.2 目的

甲状腺穿刺吸引細胞診におけるLBC（TACAS™）の有用性について検討した。

4.3 方法

2013年8月～2016年12月、新潟県立がんセンター新潟病院にて甲状腺穿刺吸引細胞診が施行され、直接塗抹法とLBC法（固定液：TACAS™Ruby）により細胞診標本が作製された1128検体を対象とした。再鏡検を行い直接塗抹法単独、LBC法単独での細胞診判定、直接塗抹法とLBC法を併せた細胞診判定を行った。また、細胞診標本の濾胞上皮細胞の出現量、コロイド量、赤血球量、細胞診標本作製時のアーチファクトを調査した。

4.4 結果

直接塗抹法単独での判定結果は、不適正：315 検体（27.9%）、囊胞液：214 検体（26.3%）、良性：437 検体（53.8%）、意義不明：78 検体（9.6%）、濾胞性腫瘍：28 検体（3.4%）、悪性の疑い：10 検体（1.2%）、悪性：46 検体（5.7%）であった。

LBC 法単独での判定結果は、不適正：77 検体（6.8%）、囊胞液：206 検体（19.6%）、良性：638 検体（60.7%）、意義不明：96 検体（9.1%）、濾胞性腫瘍：45 検体（4.3%）、悪性の疑い：5 検体（0.5%）、悪性：61 検体（5.8%）であった。

直接塗抹法と LBC 法を併せた判定結果は、不適正：69 検体（6.1%）、囊胞液：183 検体（17.3%）、良性：662 検体（62.5%）、意義不明：96 検体（9.1%）、濾胞性腫瘍：51 検体（4.8%）、悪性の疑い：5 検体（0.5%）、悪性：62 検体（5.9%）であった（表 14）。

濾胞上皮細胞が確認できた検体は直接塗抹法：789 検体（70.0%）、LBC 法：943 検体（83.6%）であった。甲状腺癌取扱規約第 7 版の報告様式において、検体が適正とされる 10 個程度の濾胞上皮細胞からなる集塊が 6 個以上を満たした検体は直接塗抹法：546 検体（48.4%）、LBC 法：834 検体（73.9%）であった（図 11）。コロイドは直接塗抹法：509 検体（45.1%）、LBC 法：371 検体（32.9%）で認めた。検体が適正となる多量のコロイドは直接塗抹法：213 検体（18.9%）、LBC 法：12 検体（1.1%）であった（図 12）。赤血球が多量であった検体は直接塗抹法：615 検体（54.5%）、LBC 法：207 検体（18.4%）であった（図 13）。細胞診標本作製時のアーチファクトは直接塗抹法で乾燥が目立ち、細胞診標本の 80%以上が乾燥していた検体が 27 検体（2.4%）あったが、LBC 法では細胞診標本の乾燥はなかった（図 14）。

4.5 考察

不適正の比率が直接塗抹法では 27.9%であったが、LBC 法では 6.8%

となり、LBC 法では不適正の検体が大幅に減少した。直接塗抹法の 70.0%、LBC 法の 83.6%で濾胞上皮細胞が確認できたが、甲状腺癌取扱い規約第 7 版の報告様式では、10 個程度の濾胞上皮細胞からなる集塊が 6 個以上を満たした検体が適正とされ、甲状腺癌取扱い規約第 6 版よりも検体適正とする基準が厳しくなっている。そのため、甲状腺癌取扱い規約第 7 版の報告様式で適正となる検体は、直接塗抹法で 48.4%、LBC 法で 73.9%となり、直接塗抹法では濾胞上皮細胞が確認できない検体が多く、濾胞上皮細胞が確認できても検体が適正となる濾胞上皮細胞量を得ることが難しいため、数値目標である不適正検体 10%以下を大きく上回る結果であった。LBC 法では濾胞上皮細胞を確認できる検体が多く、適正となる濾胞上皮細胞量を得られることが多いため、不適正検体は 10%以下となり LBC 法の導入は細胞診の不適正率の低下につながる。

濾胞性腫瘍と判定した検体は直接塗抹法では 28 検体であったが、LBC 法では 45 検体となり、濾胞性腫瘍と判定した検体が LBC 法で増加した。悪性と判定した検体は直接塗抹法では 46 検体であったが、LBC 法では 61 検体となり、悪性と判定した検体も LBC 法で増加した。濾胞性腫瘍の細胞診判定において、濾胞上皮細胞の過多は判断基準の一つであり、濾胞上皮細胞量が少数の検体では濾胞性腫瘍の判定が難しい。悪性の細胞診判定では、異型細胞がごく少数の場合には悪性と断定することが難しい。LBC 法では直接塗抹法に比し採取細胞が多数出現する傾向にある。また、赤血球多量の検体が直接塗抹法では 615 検体であったのに対し、LBC 法では 207 検体であった。多量の赤血球は濾胞上皮細胞の塗抹を減少させ、かつ細胞診標本の観察を不明瞭にする。LBC 法では赤血球が溶血されている検体が多く、濾胞上皮細胞の観察が容易となる。さらに、細胞診標本作製時のアーチファクトである乾燥は細胞診標本の観察を不明瞭にする。標本の 80%以上が乾燥していた検体が直接塗抹法で 27 検体あったが、LBC 法では細胞診標本の乾燥はなかった。LBC 法では多数の濾胞上皮細胞を得ることができ、観察が容易な標本が作製可能であり、細胞診判定の精度向上に寄

与する。

しかし、コロイドは直接塗抹法で 45.1%、LBC 法で 32.9%に認められたが、LBC 法ではコロイドが標本作製の過程で消失または濃縮され、検体が適正となるコロイド量を認めた検体は直接塗抹法で 18.9%、LBC 法で 1.1%となり、LBC 法ではコロイド量で検体適正とできる検体が減少した。多量の液状コロイドは良性病変の判断指標とされており、コロイドの性状も重要な所見であるが、LBC 法では濃縮される傾向にあった。また、直接塗抹法では濾胞上皮細胞が確認できたが、LBC 法では濾胞上皮細胞を確認できなかった検体や LBC 法よりも直接塗抹法が細胞診判定に適していた検体が少なからず存在した。直接塗抹法が細胞診判定に有用であった検体が存在することから、LBC 法は単独で使用するよりも直接塗抹法と併用し細胞診判定を行うことが有用である。

LBC 法 (TACAS™) は、甲状腺穿刺吸引細胞診において不適正率の低下および判定精度の向上に寄与する。また、LBC 法を直接塗抹法と併用することで細胞診判定に最大限の効果を発揮する。

第 5 章

甲状腺腫瘍における遺伝子検査の有用性

5.1 背景

近年、白血病やリンパ腫、種々の固形癌の診断や治療の選択に遺伝子検査が用いられている。甲状腺腫瘍でも遺伝子変異に関する研究は数多く行われており、組織型と関連が深い遺伝子異常 (*BRAF* 変異、*RAS* 変異、*RET* 再構成、*PAX8/PPAR γ* 再構成など) や腫瘍のプログレッションに関係する遺伝子異常 (*TERT* 変異、*p53* 変異など) が報告されてきた¹⁾。これらの遺伝子異常は甲状腺腫瘍の組織診断の限界ともいえる困難領域 (Well-differentiated tumor of uncertain malignant potential、Well-differentiated carcinoma, not otherwise specified、Non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features) に有用な情報をもたらし、腫瘍の良悪性を形態像とは異なる面から推定できる可能性がある。また、2015 American Thyroid Association Management Guidelines²⁾では、細胞診において Atypia of undetermined significance / Follicular lesion of undetermined significance と判定された場合、細胞診の再検もしくは分子生物学的検索を行う、Follicular neoplasm / Suspicious for follicular neoplasm の判定では外科的切除の代わりに分子生物学的検索を行う、Suspicious for malignancy では外科切除の適応に影響を及ぼす可能性があるならば分子生物学的検索を行うことが臨床的対応として推奨されている。また、The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, Second Edition³⁾においても臨床的対応に分子生物学的検索が導入された。乳頭癌における遺伝子異常の頻度は *BRAF* 変異 45~90%、*RET* 再構成 5~15%、*RAS* 変異 5~10%、濾胞癌における遺伝子異常の頻度は *RAS* 変異 30~60%、*PAX8/PPAR γ* 再構成 30~60%と報告されている⁴⁾。本邦を含む東アジアでは乳頭癌における *BRAF* 変異の頻度が 60~90%と欧米の報告に比べ高く⁵⁾、遺伝子検

査を行うことにより診断精度の向上や術前の診断確定に寄与するものと思われる。

5.2 目的

甲状腺腫瘍における遺伝子検査の有用性に関して検討を行った。

5.3 方法

5.3.1 患者と組織検体

2013～2017年に新潟県立がんセンター新潟病院頭頸部外科にて甲状腺の手術が施行され、組織学的に診断の確定した通常型乳頭癌：15例、濾胞癌（好酸性細胞型を除く）：15例、濾胞腺腫（好酸性細胞型を除く）：5例、腺腫様甲状腺腫：5例を対象とした。本研究は新潟県立がんセンター新潟病院倫理審査委員会にて承認されている（研究番号：850. 承認日：2018年4月18日）。

5.3.2 Deoxyribonucleic acid (DNA)・Ribonucleic acid (RNA) 抽出

10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded; FFPE) ブロックから、厚さ $5\mu\text{m}$ 程度に3～5枚薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色 (Hematoxylin-eosin; HE) 標本を作製した。Manual dissection (顕微鏡にて腫瘍部分を確認し、腫瘍の密な部分のみをメス等で削り取る) を行い、組織切片をマイクロチューブに回収した。AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN) を使用して DNA および Total RNA の抽出し、Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) にて DNA と RNA の濃度を測定した。

5.3.3 BRAF 変異・RAS 変異の検出

BRAF 変異 (exon 15) と *RAS* 変異 (*NRAS* exon 2、*NRAS* exon 3、*KRAS* exon 2、*KRAS* exon 3、*HRAS* exon 2、*HRAS* exon 3) の検出は、LightCycler®

480 (Roche) を用いて Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) および High resolution melting analysis (HRM) により行った。

Real-time PCR・HRM 反応液 (全量 20 μ L)

- 1 \times High-resolution melting mater mix (Roche)
- 3.5mM MgCl₂
- 0.2 μ M each primer (配列は表 15 に示す)
- Template DNA 10~20ng

Real-time PCR と HRM の反応条件

- Fast start DNA polymerase の活性化 95°C 10 分
- 45 cycle
 - Denature 95°C 10 秒
 - Annealing 58°C 30 秒
 - Extension 72°C 30 秒 (シグナル計測)
- 95°C 1 分、40°C 1 分、65°C 1 秒
- 0.02°C/秒の速度で 65°C から 95°C まで連続的に上昇 (1°C 当たり 25 回のシグナル計測)
- Cooling 40°C 30 秒

Real-time PCR 中に得られた Threshold Cycle (Ct) が 40 を超えた検体は、DNA の品質に問題があると考え、解析から除くこととした。得られたデータは LightCycler® 480 Gene-scanning software (version 1.5) を使用し、Normalization、Temperature Shift による補正を加え、Difference Plot で図を作成した。変異のない検体と比較し、Relative signal difference が 5 以上の検体を変異 (+) と判定した。変異 (+) の検体は PCR を行い、DNA sequencing を行った。

PCR 反応液 (全量 20 μ L)

- 1 \times Reaction buffer
- 0.2mM dNTP
- 1U Taq polymerase (Promega)
- 0.5 μ M each primer (Real-time PCR と同じ)
- Template DNA 10~20ng

PCR 反応条件

- Preheat 95°C 10 分

- 35 cycle

Denature 95°C 45 秒

Annealing 58°C 45 秒

Extension 72°C 1 分

- Last extension 72°C 7 分

PCR 産物を 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (200V 60 分) を行い、目的遺伝子が増幅されていることを確認した。PCR 産物を NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) にて分離回収を行い、Cycle sequencing の鋳型 DNA とした。

Cycle sequencing 反応液 (全量 10 μ L)

- BigDye Terminator Ready reaction mix (Thermo Fisher Scientific) 2 μ L

- Sequencing buffer 1.3 μ L

- Primer 3.2pmol (*BRAF* exon 15、*KRAS* exon 3、*HRAS* exon 2、*HRAS* exon 3 は Forward primer を使用し、*NRAS* exon 2、*NRAS* exon 3、*KRAS* exon 2 は Reverse primer を使用)

- 鋳型 DNA 1 μ L

Cycle sequencing 反応条件

- Preheat 96°C 1 分

- 25 cycle

Denature 96°C 10 秒

Annealing 50°C 5 秒

Extension 60°C 2 分

Cycle sequencing 後の反応液を BigDye Xterminator™ Kit により精製し、Hi-Di formamide を混和した。Applied Biosystems® 3500 Dx (Thermo Fisher Scientific) にてキャピラリー電気泳動を行い、塩基配列を決定した。

5.3.4 *RET* 再構成・*PAX8/PPAR* γ 再構成の検出

RET 再構成 (*RET/PTC1*、*RET/PTC3*)、*PAX8/PPAR* γ 再構成の検出は、Reverse Transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) により行った。Total RNA から complementary DNA (cDNA) の合成は、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて行った (Primer は Random hexamer primer を使用)。PCR で *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* の増幅を認めた検体のみ *RET/PTC1*、*RET/PTC3*、*PAX8/PPAR* γ の PCR を行った。

PCR 反応液 (全量 20 μ L)

- 1 \times Reaction buffer
- 0.2mM dNTP
- 1U Taq polymerase (Promega)
- 0.5 μ M each primer (配列は表 15 に示す)
- cDNA 1 μ L

PCR 反応条件

- Preheat 95°C 10 分
- 35 cycle
 - Denature 95°C 45 秒
 - Annealing 60°C 45 秒
 - Extension 72°C 1 分
- Last extension 72°C 7 分

PCR 反応液を 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (200V 60 分) を行い、PCR 増幅産物の有無を確認した。PCR 増幅産物 (+) の検体は cDNA sequencing を行った。*BRAF* 変異・*RAS* 変異の検出と同様に PCR 増幅産物から分離回収を行い、塩基配列を決定した。

5.4 結果

5.4.1 核酸品質

40例の検体から抽出したDNA濃度は32.4~1317.4 ng/ μ L（平均324.68 ng/ μ L）であった。Real-time PCRでCtが40以上を示した検体は認められず、本検討のHRMにおいて全例で結果が得られた。RNA濃度は1.5~389.2 ng/ μ L（平均114.66 ng/ μ L）であった。RT-PCRにおける*GAPDH*発現は全例で増幅が確認された。

5.4.2 遺伝子解析結果

遺伝子解析の結果を表16に示す。

乳頭癌では、HRMにて15例中12例に*BRAF*変異を認めた。DNA sequencingにおいて、12例ともに*BRAF*遺伝子の1799番目の塩基にチミンからアデニンへの点変異があり、*BRAF* codon 600にバリンからグルタミン酸への置換（Val600Glu, V600E）を認めた（図15）。1例に*RET/PTC1*のPCRにおいて増幅を認めた。cDNA sequencingで、*CCDC6* exon 1と*RET* exon 12の融合を認めた（図16）。*RAS*変異は認めず、*PAX8/PPAR γ* 再構成は検出されなかった。乳頭癌（通常型）において、15例中13例（86.7%）に遺伝子異常を認めた。

濾胞癌では、HRMにて15例中9例に*RAS*変異（*NRAS* exon3：5例、*KRAS* exon3：2例、*HRAS* exon3：2例）を認めた。DNA sequencingにおいて、7例（*NRAS* exon 3：3例、*KRAS* exon 3：2例、*HRAS* exon 3：2例）は182番目の塩基にアデニンからグアニンへの点変異があり、codon 61にグルタミンからアルギニンへの置換（Gln61Arg, Q61R）を認めた。2例（*NRAS* exon 3：2例）は181番目の塩基にシトシンからアデニンへの点変異があり、codon 61にグルタミンからリジンへの置換（Gln61Lys, Q61K）を認めた（図17-18）。また、PCRで1例に*PAX8/PPAR γ* の増幅を認めた。cDNA sequencingにより、*PAX8* exon 7と*PPAR γ* exon 2の融合を認めた（図19）。*BRAF*変異は認めず、*RET*

再構成は検出されなかった。濾胞癌（好酸性細胞型を除く）において 15 例中 10 例（66.7%）に遺伝子異常を認めた。

濾胞腺腫（好酸性細胞型を除く）、腺腫様甲状腺腫では、*BRAF* 変異、*RAS* 変異は認めず、*RET* 再構成、*PAX8/PPAR γ* 再構成も検出されなかった。

5.5 考察

乳頭癌では、*BRAF* 変異の頻度には地域差がある。欧米では 50% 前後の報告が多いが、東アジアではこの頻度は高く、特に本邦や韓国では 60~90% とする報告が多い⁶⁾。本検討では 15 例中 12 例（80.0%）に *BRAF* 変異を認め、本邦や韓国の報告と同様の結果であった。*BRAF* 変異（-）の 1 例で *RET* 再構成が検出され、検索した乳頭癌症例の 86.7% に遺伝子異常を認めた。濾胞癌、濾胞腺腫や腺腫様甲状腺腫では *BRAF* 変異、*RET* 再構成が検出されなかった。形態的所見不足で乳頭癌と確定できない症例に遺伝子検査を追加することは、乳頭癌の確定診断の増加につながると考える。乳頭癌症例において細胞診検体を用いた遺伝子検査の有用性は報告されている⁷⁾⁸⁾。実際に細胞診で乳頭癌の確定診断が得られなかった LBC 標本（TACASTM Ruby 固定、パパニコロウ染色）を使用し、本検討と同様の方法を行ったところ、*BRAF* 変異、*RET/PTC1* 再構成が検出された症例があった（表 17、図 20-22）。*RET* 再構成は乳頭癌に特異的で、低分化癌や未分化癌ではほとんど検出されないため、腫瘍の悪性度を形態像とは異なる面から推定可能である⁹⁾。

濾胞癌（好酸性細胞型を除く）では、*RAS* 変異の頻度は 30~60% と報告されている。本検討では 15 例中 9 例（60.0%）に *RAS* 変異を認め、これまでの報告と同様の結果であった。*PAX8/PPAR γ* 再構成の頻度の報告は 30~60% であるが、本邦を含む東アジアでは *PAX8/PPAR γ* 再構成の頻度はこれより低いと報告されている¹⁾。本検討でも *PAX8/PPAR γ* 再構成が検出された症例は 1 例（6.7%）であった。検索した濾胞癌

の遺伝子異常の頻度は 66.7%と乳頭癌に比べると低い結果であったが、乳頭癌、濾胞腺腫、腺腫様甲状腺腫では *RAS* 変異、*PAX8/PPAR* γ 再構成は検出されなかったことから、これらの遺伝子異常が検出された場合、濾胞癌である可能性が高いと言える。しかし、*RAS* 変異は濾胞型乳頭癌や濾胞腺腫に認められ、*PAX8/PPAR* γ 再構成は濾胞腺腫に頻度が少ないながらも検出されると報告⁴⁹⁾されており、*RAS* 変異、*PAX8/PPAR* γ 再構成を濾胞癌のマーカーとするには問題がある。*RAS* 変異を有する濾胞腺腫は濾胞癌の前駆病変や浸潤前の段階で切除された濾胞癌である可能性が高いとする報告¹⁰⁾や悪性のポテンシャルを持っており、濾胞腺腫の診断は慎重に行うべきとの報告¹¹⁾がある。

PAX8/PPAR γ 再構成は濾胞腺腫では稀であるが、濾胞癌では変異陽性率が高くなるため、濾胞腺腫から濾胞癌への進行に関わる遺伝子異常と推測されており、*PAX8/PPAR* γ 再構成を有する濾胞腺腫は既に *in situ* の濾胞癌である可能性が高いとの報告¹²⁾がある。これらの報告は、濾胞性腫瘍（好酸性細胞型を除く）において *RAS* 変異、*PAX8/PPAR* γ 再構成が腫瘍の癌化に関連することを示唆している。また、*NRAS* 変異を有する濾胞癌は遠隔転移との相関が高いとの報告¹¹⁾がある。本検討では遺伝子異常が検出された濾胞癌 10 例のうち 7 例は広範浸潤型濾胞癌で、3 例は血管侵襲を伴う微小浸潤型濾胞癌であった。遺伝子異常が検出されなかった 5 例は血管侵襲のない微小浸潤型濾胞癌であった（表 18）。WHO 第 4 版¹³⁾では、濾胞癌を *widely invasive*、*minimally invasive* の 2 つのグループから、悪性度（予後）の違いから *widely invasive*、*encapsulated angioinvasive*、*minimally invasive (capsular invasion only)* の 3 つのグループに変更している。遺伝子異常が検出された 10 例は悪性度の高いグループ（*widely invasive*、*encapsulated angioinvasive*）に属しており、*RAS* 変異、*PAX8/PPAR* γ 再構成と腫瘍の悪性度が関連していると考えられる。濾胞癌の診断確定については、*RAS* 変異、*PAX8/PPAR* γ 再構成が検出された場合、濾胞形成を示す腫瘍性病変（多くは悪性腫瘍）と過形成性病変の区別が可能になる。また、*PAX8/PPAR* γ 再構成を有する濾胞癌は、未分化転化を起こさないとの報告¹⁴⁾があり、腫

瘍の悪性度を形態像とは異なる面から推定でき、治療方針の決定に影響を及ぼす可能性がある。

Nikiforov ら⁷⁾は、甲状腺穿刺吸引細胞診において遺伝子検査を組み合わせることにより診断精度が改善されると報告している。

Bellevicine ら⁸⁾は、遺伝子検査が甲状腺穿刺吸引細胞診にて意義不明と判定された検体において、悪性のリスク（悪性が含まれる割合）による層別化を改善できるとしている。乳頭癌と良性病変の鑑別、濾胞性腫瘍と過形成性病変との鑑別が難しい症例において、遺伝子検査を追加することにより良悪性の鑑別が可能な症例が増加し、診断精度を高めることができる。また、核所見や浸潤所見の有無の判断が病理医間の **observer variation** の原因ともなっている甲状腺腫瘍において、遺伝子検査は組織型や悪性度の判定に有用な情報をもたらすことが期待される。

甲状腺腫瘍において、**BRAF** 変異、**RAS** 変異、**RET** 再構成、**PAX8/PPAR γ** 再構成は組織型に特異性の高い遺伝子異常である。甲状腺腫瘍においてこれらの遺伝子検査を行うことは形態診断の困難な症例において有用な情報をもたらし、診断精度の向上に寄与すると考える。

第 6 章

結論

甲状腺領域において穿刺吸引細胞診の判定結果は治療開始等に影響を及ぼす。患者の中には長期にわたり確定診断にいたらず、診療上問題が生じるため甲状腺穿刺吸引細胞診が複数回行われることがある。患者に多くの負担をかけることを避けるためにも細胞診の適正な判定や精度の向上が必要である。今回、濾胞性腫瘍の判定基準を変更したこと、甲状腺癌で最も多い乳頭癌を細胞診で悪性と判定できなかった原因を追究したことにより、甲状腺穿刺吸引細胞診の適正な判定や精度の向上に寄与できた。

また、LBC法の導入により細胞所見を追加することができ、細胞診の不適正率の低下および判定精度の向上ができる。遺伝子検査の追加は形態学とは異なる側面から有用な情報をもたらすことができる。

LBC法の導入や遺伝子検査の追加といった新たなツールを使用することは、甲状腺穿刺吸引細胞診の適正な判定や精度の向上につながる。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導をいただきました新潟大学大学院保健
学研究科 岩渕三哉教授に深謝いたします。

引用文献

第 1 章

- 1) The Japanese Society of Thyroid Surgery. General Rules for the Description of Thyroid Cancer (The 6th Edition). 金原出版. 2005.
- 2) Japanese Society of Thyroid Surgery. General Rules for the Description of Thyroid Cancer (The 7th Edition). 金原出版. 2015.
- 3) 公益社団法人日本臨床細胞学会. 細胞診ガイドライン 3 甲状腺・内分泌・神経系. 金原出版. 2015: 18-98.
- 4) 藤澤俊道他. 甲状腺濾胞性腫瘍の診断基準と診断精度－伊藤病院での検討－. 日本臨床細胞学会雑誌. 2010; 49: 42-47.
- 5) 前川観世子他. 甲状腺濾胞性腫瘍の細胞診－診断の現状と細胞学的鑑別－. 日本臨床細胞学会雑誌. 2010; 49: 48-54.
- 6) 丸田淳子他. 甲状腺穿刺細胞診－濾胞性腫瘍の取り扱い－. 日本臨床細胞学会雑誌. 2010; 49: 55-60.
- 7) 谷口恵美子他. 「良悪性鑑別困難」の細分類－腺腫様結節の細胞所見と濾胞性腫瘍の細胞所見－. 日本臨床細胞学会雑誌. 2010; 49: 61-66.

第 2 章

- 1) 廣川満良. 甲状腺篩型乳頭癌の組織診と細胞診. 日臨細胞会誌. 2014; 53: 521-527.
- 2) 越川卓, 高木希, 廣川満良. 甲状腺びまん性硬化型乳頭癌の細胞像.

日臨細胞会誌. 2014; 53: 515-520.

- 3) 高木希, 廣川満良, 延岡由梨他. 甲状腺ワルチン腫瘍様乳頭癌 33例の細胞所見. 日臨細胞会誌. 2013; 52: 116-121.
- 4) 西島 良美, 吉田 朋美, 佐野 孝昭他. 甲状腺びまん性硬化型乳頭癌の 1 例. 日臨細胞会誌. 2012; 51: 402-408.
- 5) 清山 和昭, 栗林 忠信, 古賀 和美. 好酸性細胞型乳頭癌の 1 例. 日臨細胞会誌. 1996; 35: 51-52.
- 6) 深沢 政勝, 菅間 博, 中村 靖司. 術前の穿刺吸引細胞診にて診断し得た甲状腺好酸性細胞型乳頭癌の 1 例. 日臨細胞会誌. 1995; 34: 782-783.
- 7) The Japanese Society of Thyroid Surgery. General Rules for the Description of Thyroid Cancer (The 6th Edition). 金原出版. 2005.
- 8) Japanese Society of Thyroid Surgery. General Rules for the Description of Thyroid Cancer (The 7th Edition). 金原出版. 2015.
- 9) 公益社団法人日本臨床細胞学会. 細胞診ガイドライン 3 甲状腺・内分泌・神経系. 金原出版. 2015: 18-98.

第 3 章

- 1) 鈴木彩菜, 廣川満良, 延岡由梨他. 甲状腺細胞診「不適正」の評価—甲状腺ベセスダシステム導入に向けて—. 日臨細胞会誌. 2013; 52: 304-309.
- 2) 鈴木彩菜, 廣川満良, 高木希他. 甲状腺における液状化検体細胞診

—その有用性と形態的特徴—. 日臨細胞会誌. 2013; 52: 495-501.

- 3) 前田智治, 古谷敬三, 平田真紀子他. 甲状腺穿刺吸引細胞診における従来法と液状処理細胞診 (LBC) の比較について. 日臨細胞会誌. 2010; 49: 108-111.
- 4) 山口 朋美, 大貫 なつみ, 赤羽 俊章他. 甲状腺穿刺吸引細胞診における LBC プレップ 2 を用いた液状処理細胞診 (LBC). 日臨細胞会誌. 2017; 56: 130-136.
- 5) Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria and Explanatory Notes. Springer, New York. 2010.

第 4 章

- 1) 光武範吏. 甲状腺がんの遺伝子変異. 最新医学. 2017; 72(10): 1432-1438.
- 2) Haugen et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid. 2016; 26(1): 1-133.
- 3) Ali S, Cibas E. Overview of Diagnostic Terminology and Reporting, Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance, Suspicious for Malignancy. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. Second edition. Springer, New York. 2018: 1-156.

- 4) 近藤哲夫. 分子生物学的手法による甲状腺腫瘍診断. 臨床病理. 2017; 65(9): 1010-1017.
- 5) Song YS et al. Mutation Profile of Well-Differentiated Thyroid Cancer in Asians. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015; 30: 252-262.
- 6) Melck AL et al. The utility of BRAF testing in the management of papillary thyroid cancer. *Oncologist*. 2010; 15(12): 1285-1293.
- 7) Nikiforov YE et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(6): 2092-2098.
- 8) Bellevicine C et al. Different qualifiers of AUS/FLUS thyroid FNA have distinct BRAF, RAS, RET/PTC, and PAX8/PPAR γ alterations. *Cancer Cytopathol*. 2018; 12(5): 317-325.
- 9) 加藤良平. 甲状腺癌の遺伝子診断は有用か?. 内分泌甲状腺外会誌. 2017; 34(2): 88-92.
- 10) Nikiforova MN et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(5): 2318-2326.
- 11) Fukahori M et al. The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid*. 2012; 22(7): 683-689.
- 12) Klemke M et al. On the prevalence of the PAX8-PPARG fusion resulting

from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid. *Cancer Genet.* 2011; 204(6): 334-339.

13) Lloyd RV et al. Tumours of the thyroid gland. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th Edition. IARC, Lyon. 2017: 68-95.

14) Dwight T et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(9): 4440-4445.

図表

図 1. 腺腫様結節、濾胞腺腫、濾胞癌の組織像（細胞所見）

A：腺腫様結節 B：濾胞腺腫 C：濾胞癌

個々の細胞所見では腺腫様結節、濾胞腺腫、濾胞癌を区別できない。

図 2. 腺腫様結節、濾胞腺腫、濾胞癌の組織像（被膜所見）

A：腺腫様結節 B：濾胞腺腫 C：濾胞癌

腺腫様結節では全周性の被膜形成を欠く（青矢印）。濾胞腺腫・濾胞癌は線維性被膜により被包され、濾胞腺腫は腫瘍細胞の被膜浸潤なし（黄矢印）、濾胞癌は腫瘍細胞の被膜浸潤あり（緑矢印）

図 3. 濾胞腺腫・濾胞癌（好酸性細胞型を除く）の細胞像

図 4. 好酸性細胞型濾胞腺腫・濾胞癌の細胞像

図 5. 良性病変の細胞像

図 6. 正常あるいは良性と判定された濾胞腺腫の細胞像および組織像

左：細胞像 右：組織像

図 7. 嚢胞形成を示す乳頭癌の細胞像および組織像

左：細胞像 右：組織像

図 8. 濾胞構造が主体であった乳頭癌の細胞像および組織像

左：細胞像 右：組織像

図 9. びまん性硬化型乳頭癌の細胞像および組織像

左：細胞像 右：組織像

図 10. 好酸性細胞型乳頭癌の細胞像および組織像

左: 細胞像 右: 組織像

図 11. 直接塗抹法と LBC 法の細胞像 (濾胞上皮細胞)

A. C : 直接塗抹法 B. D : LBC 法

図 12. 直接塗抹法と LBC 法の細胞像 (コロイド)

A. C : 直接塗抹法 B. D : LBC 法

図 13. 直接塗抹法と LBC 法の細胞像 (赤血球)

A. C : 直接塗抹法 B. D : LBC 法

図 14. 直接塗抹法と LBC 法の細胞像 (乾燥)

A. C : 直接塗抹法 B. D : LBC 法

図 15. Representative HRM and DNA sequencing result showed *BRAF* mutation in papillary carcinoma

The sample revealed the same peaks as the mutant type control in HRM (left).

BRAF V600E: T to A transition at nucleotide 1799(c.1799T>A).

The mutant site is indicated by arrow (right).

図 16. PCR and cDNA sequencing result of *RET/PTC1* rearrangement in papillary carcinoma

10% polyacrylamide gel electrophoresis showed 135 bp PCR product of *RET/PTC1* fusion gene (left).

M: Marker, S: Sample, P: Positive control, N: Negative control.

Sequence analysis revealed a fusion site of *RET* gene and *CCDC6* gene.

The fusion site is indicated by arrow (right).

☒ 17. Representative HRM and DNA sequencing result of *RAS* mutations in follicular carcinomas

A. *NRAS* Q61R: A to G transition at nucleotide 182 (c.182A>G).

B. *NRAS* Q61K: C to A transition at nucleotide 181 (c.181C>A).

The mutant sites are indicated by arrows.

☒ 18. Representative HRM and DNA sequencing result of *RAS* mutations in follicular carcinomas

C. *KRAS* Q61R: A to G transition at nucleotide 182 (c.182A>G).

D. *HRAS* Q61R: A to G transition at nucleotide 182 (c.182A>G).

The mutant sites are indicated by arrows.

☒ 19. PCR and cDNA sequencing result of *PAX8/PPAR* γ rearrangement in follicular carcinoma

10% polyacrylamide gel electrophoresis showed 78 bp PCR product of *PAX/PPAR* γ fusion gene (left).

M: Marker, S: Sample, P: Positive control, N: Negative control.

Sequence analysis revealed a fusion site of *PAX8* gene and *PPAR* γ gene.

The fusion site is indicated by arrow (right).

☒ 20. 細胞診検体を用いた遺伝子検査（症例 1）

A : 直接塗抹法 B : LBC 法 C : HRM D : DNA sequencing

☒ 21. 細胞診検体を用いた遺伝子検査（症例 2）

A : 直接塗抹法 B : LBC 法 C : RT-PCR D : cDNA sequencing

☒ 22. 細胞診検体を用いた遺伝子検査（症例 3）

A : 直接塗抹法 B : LBC 法 C : HRM D : DNA sequencing

- 表 1. 甲状腺穿刺吸引細胞診判定結果（2006～2013 年、2275 検体）
- 表 2. 濾胞性腫瘍と良性病変の細胞所見
- 表 3. 鑑別困難例の再判定結果（2006～2013 年、963 検体）
- 表 4. 鑑別困難例再判定後の判定比率（2006～2013 年、2275 検体）
- 表 5. 濾胞腺腫・濾胞癌症例の再判定結果（2006～2013 年）
- 表 6. 判定基準変更後の判定結果（2014 年 4 月～2016 年 11 月）
- 表 7. 細胞診判定と組織診断の比較（2014 年 4 月～2016 年 11 月、38 症例）
- 表 8. 新報告様式による判定結果（2006～2013 年、2275 検体）
- 表 9. 新報告様式による判定結果（2014 年 4 月～2016 年 11 月、332 検体）
- 表 10. 2010～2015 年に手術が施行された甲状腺検体（172 例）
- 表 11. 乳頭癌症例の細胞診判定（2010～2015 年、85 例）
- 表 12. 鑑別困難例の再鏡検結果
- 表 13. 正常あるいは良性、不適正例の再鏡検結果
- 表 14. 直接塗抹法単独、LBC 法単独、直接塗抹法と LBC 法を併せた細胞診判定結果

表 15. List of primers used for PCR and sequence analysis

表 16. The prevalence rate of genetic alterations in thyroid tumors

表 17. 細胞診検体を用いた遺伝子検査結果

表 18. 濾胞癌の遺伝子検査結果（WHO 第 4 版による分類）

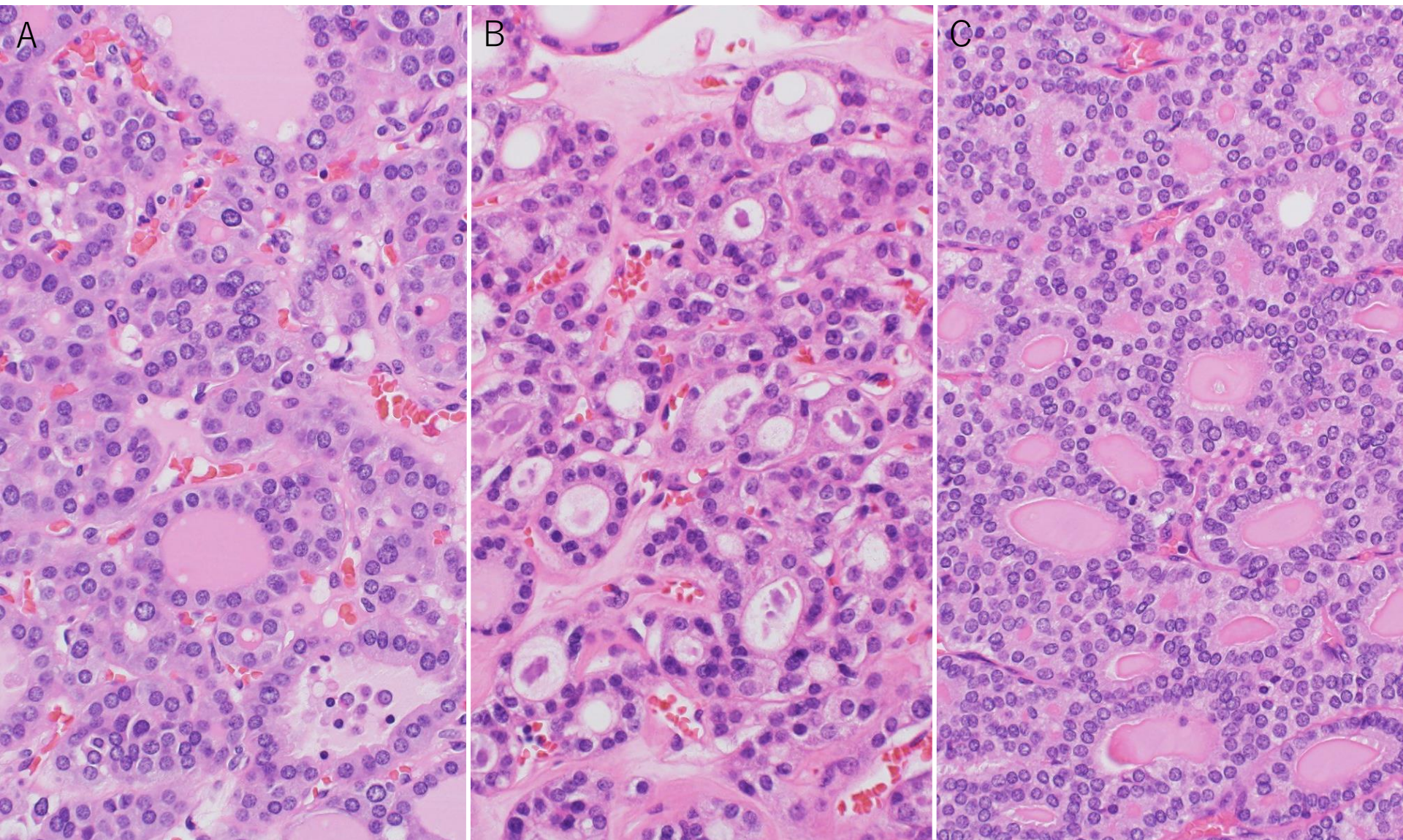


図1. 腺腫様結節、濾胞腺腫、濾胞癌の組織像（細胞所見）

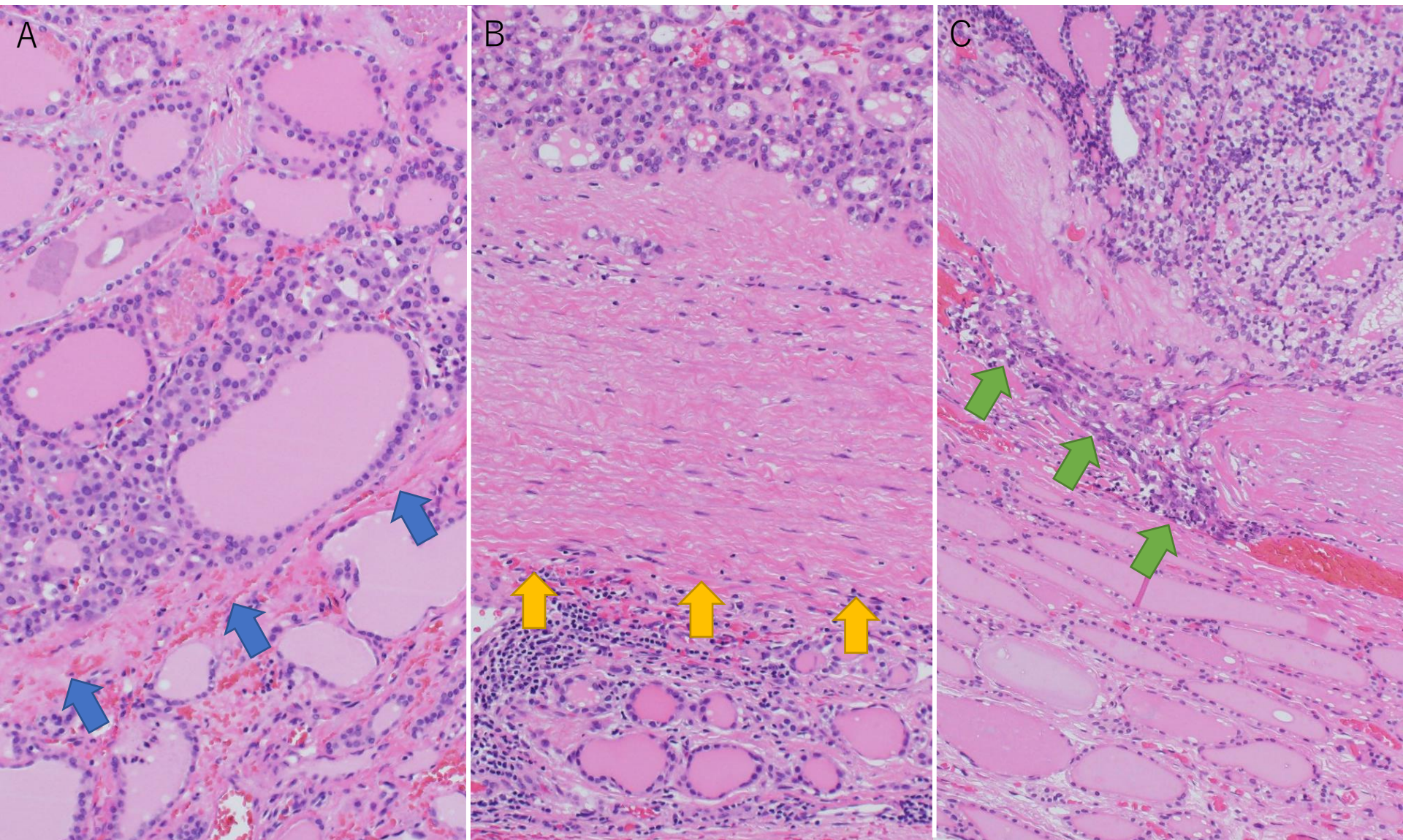


図2. 腺腫様結節、濾胞腺腫、濾胞癌の組織像（被膜所見）

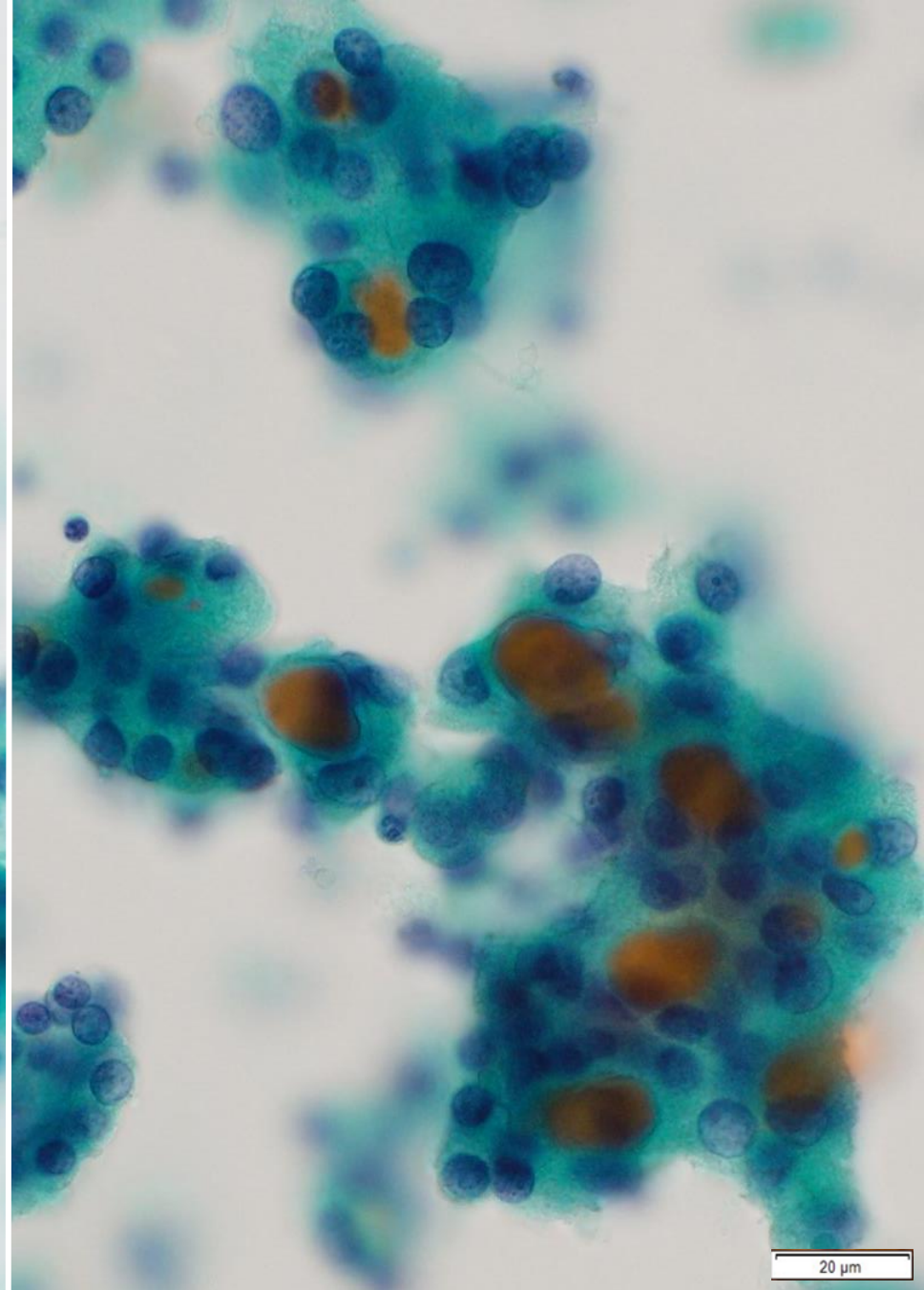
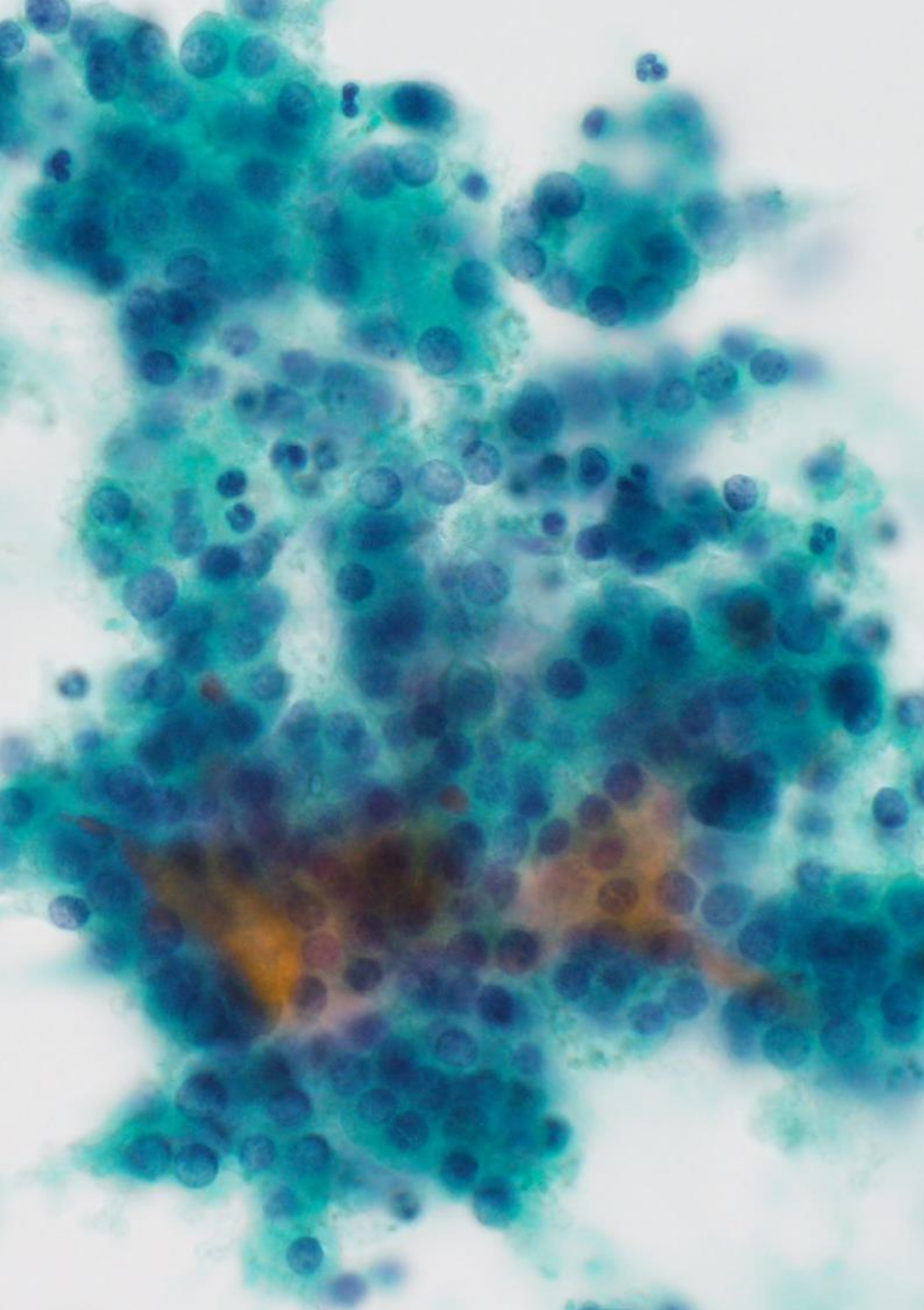


図3. 濾胞腺腫・濾胞癌（好酸性細胞型を除く）の細胞像

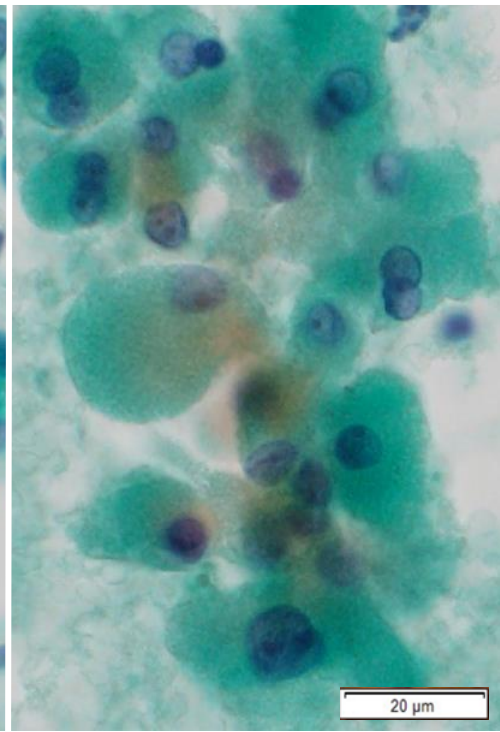
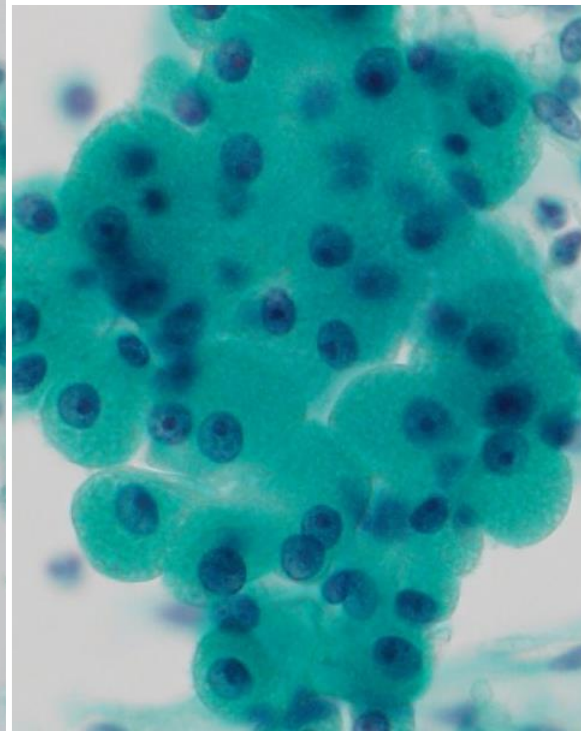
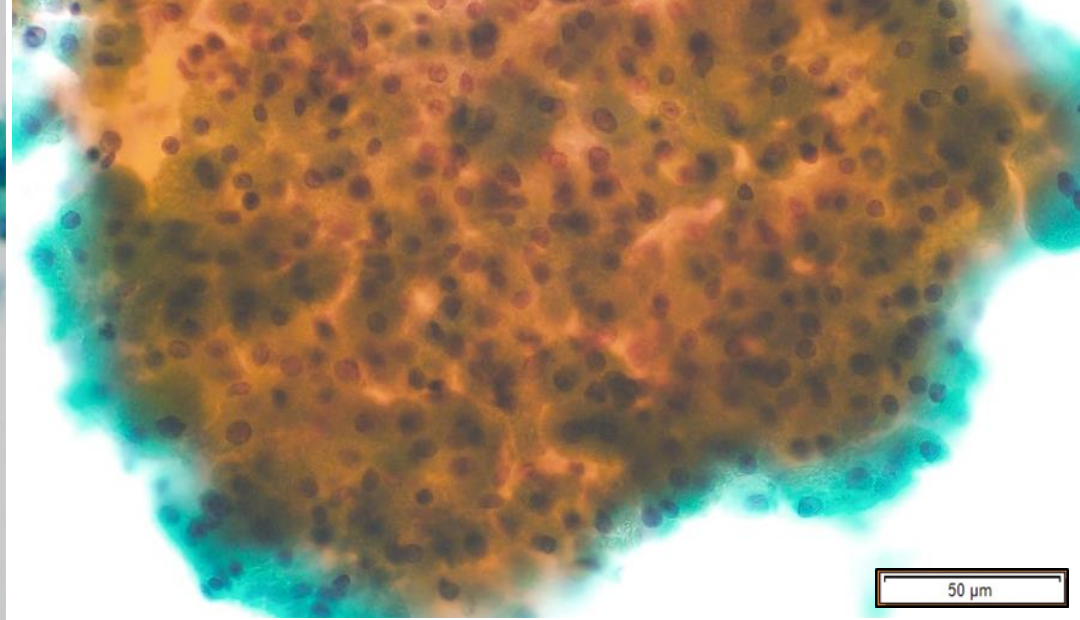
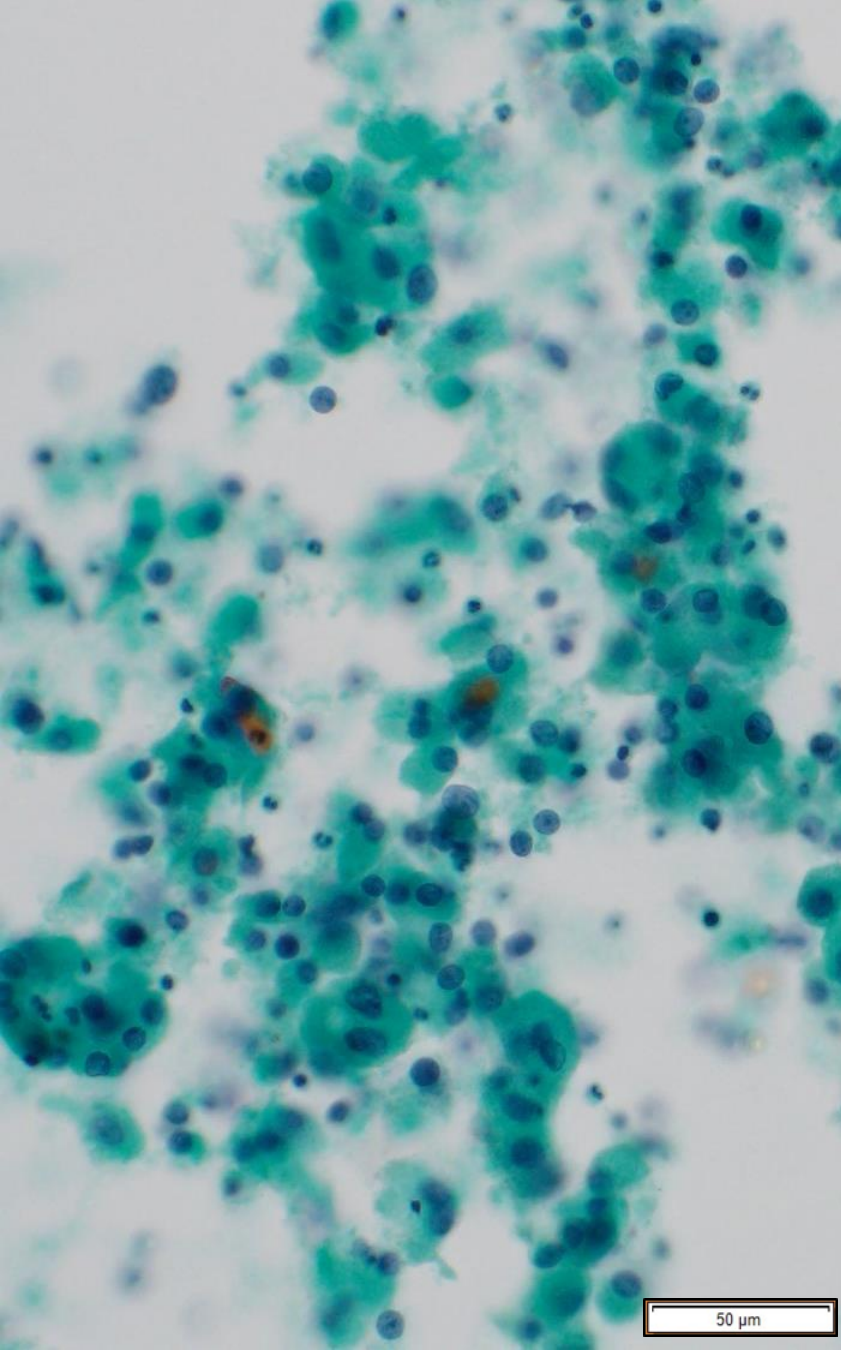


図4. 好酸性細胞型濾胞腺腫・濾胞癌の細胞像

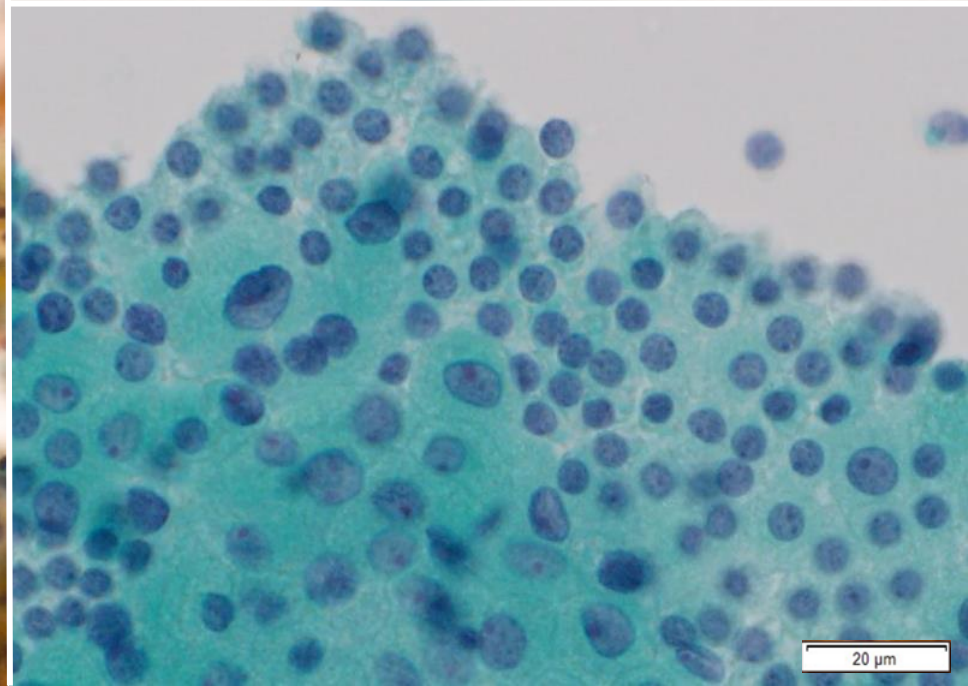
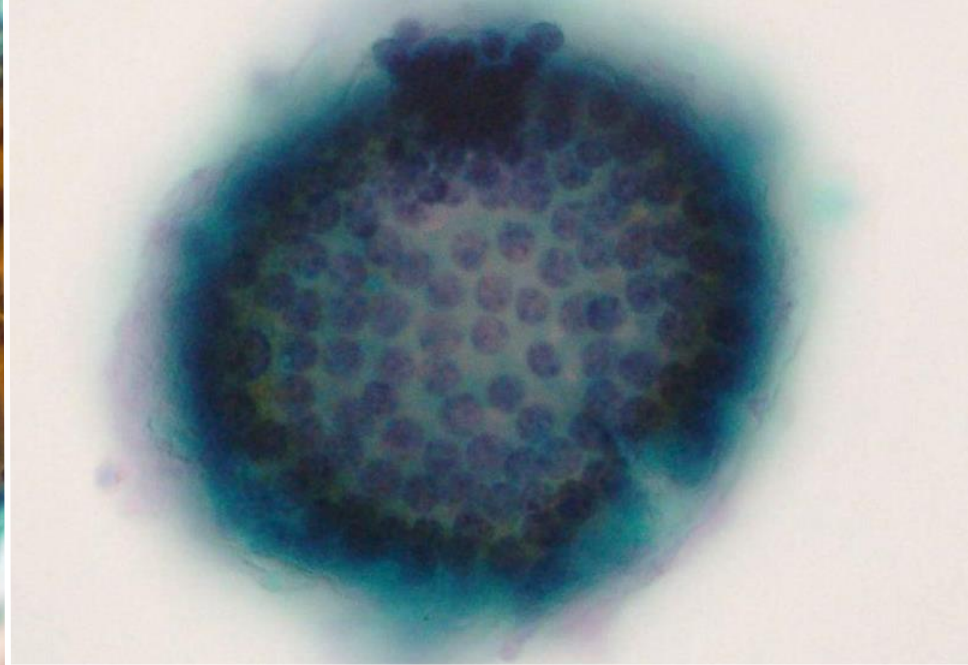
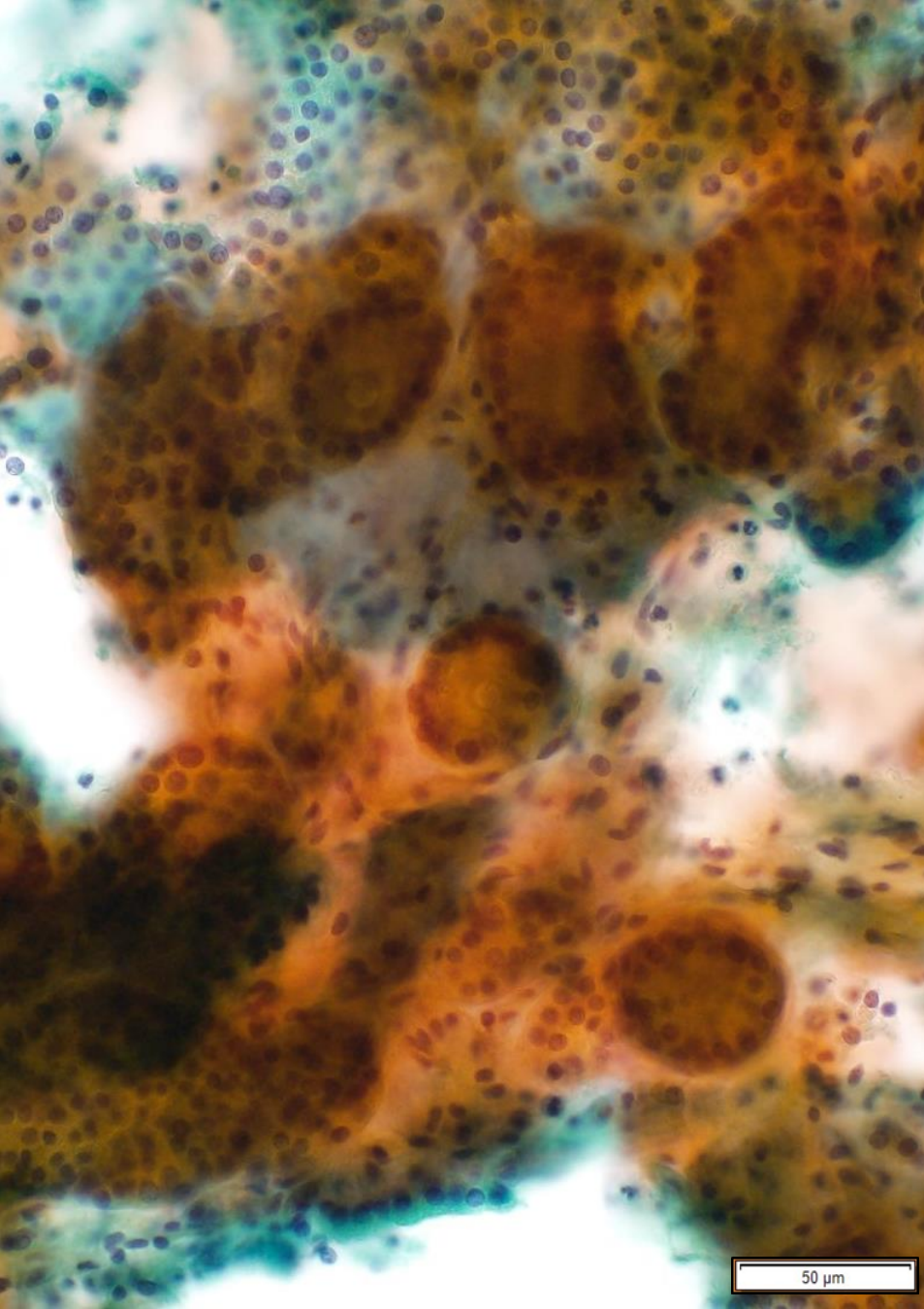


図5. 良性病変の細胞像

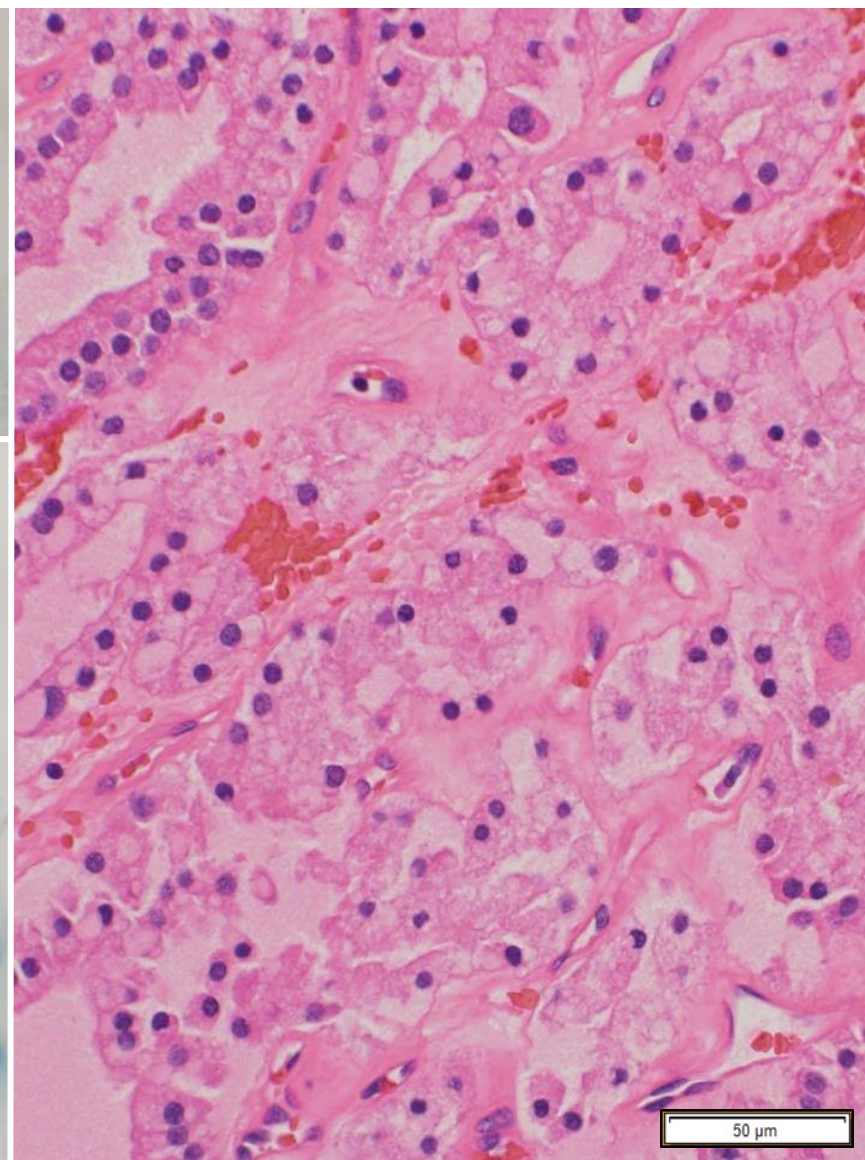
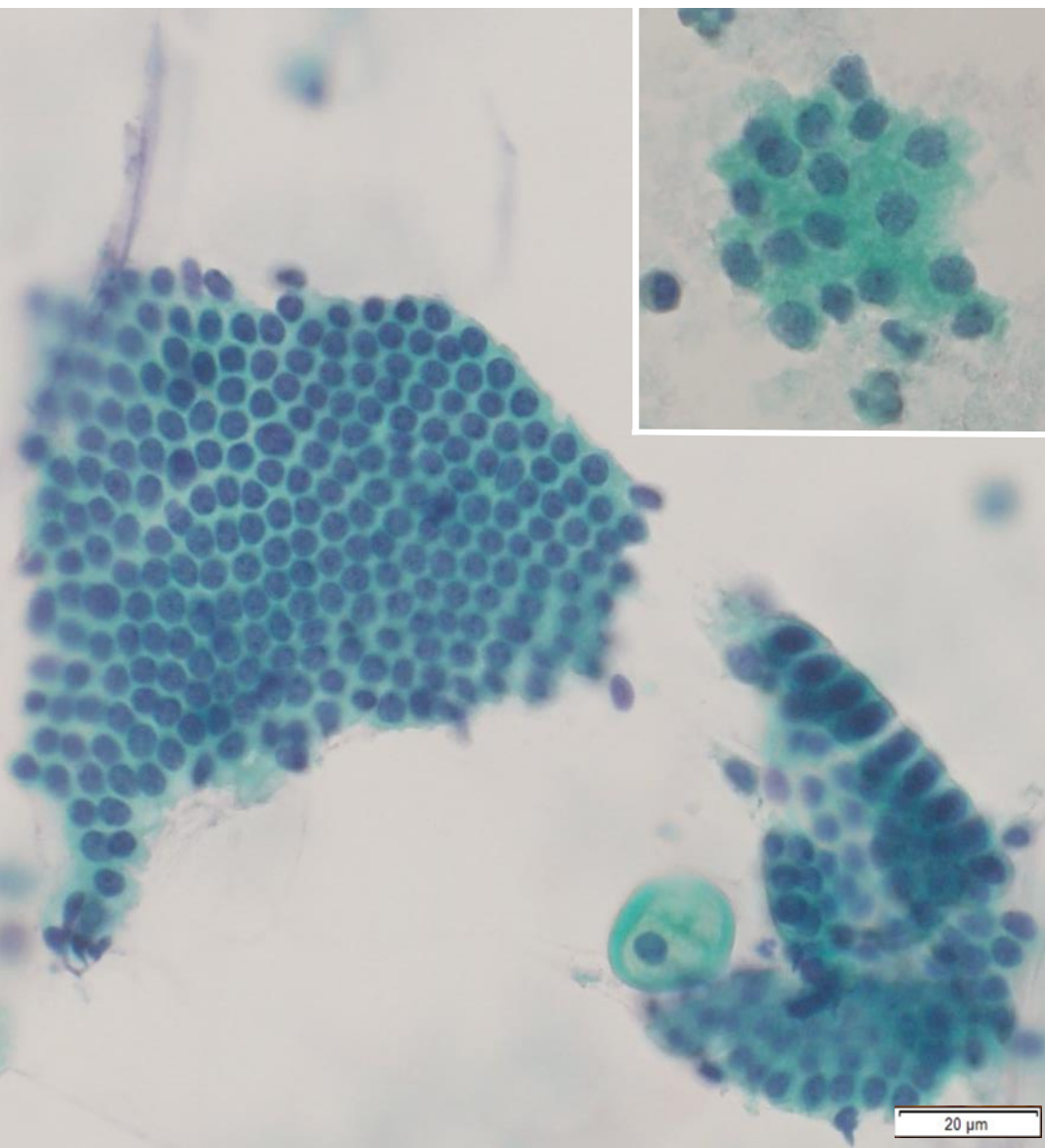


図6. 正常あるいは良性と判定された濾胞腺腫の細胞像および組織像

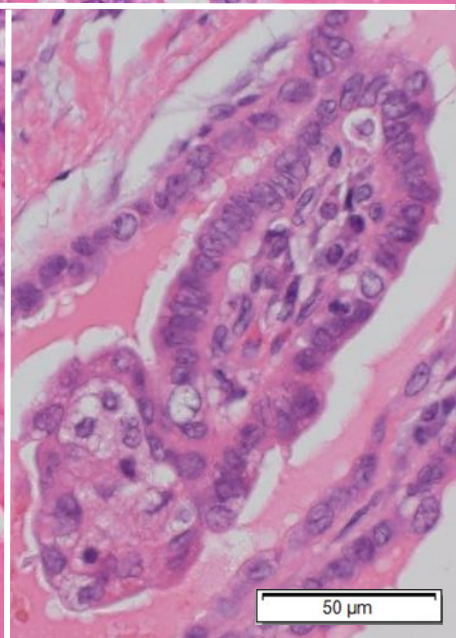
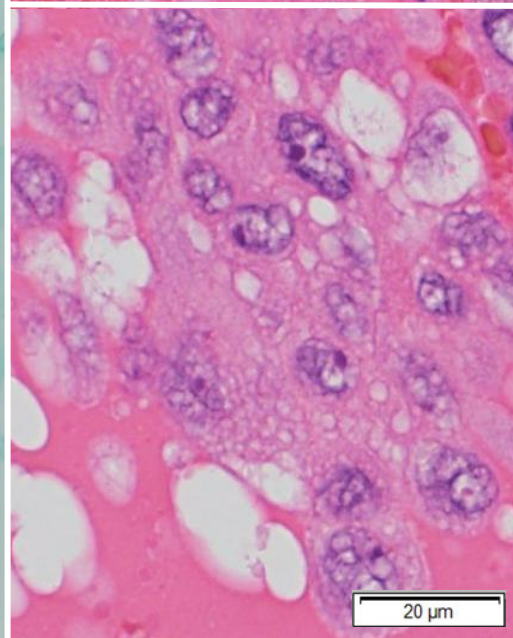
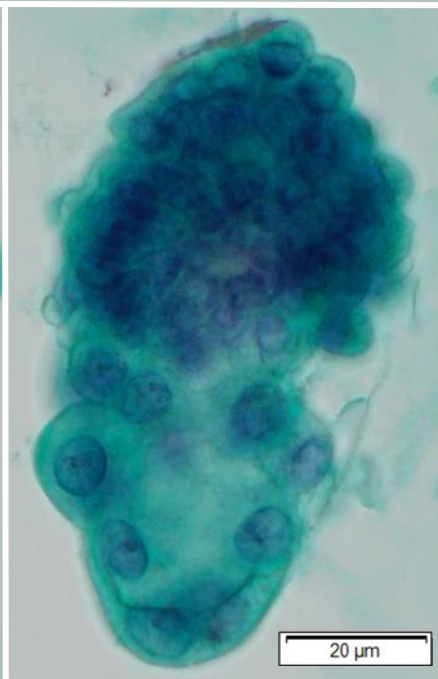
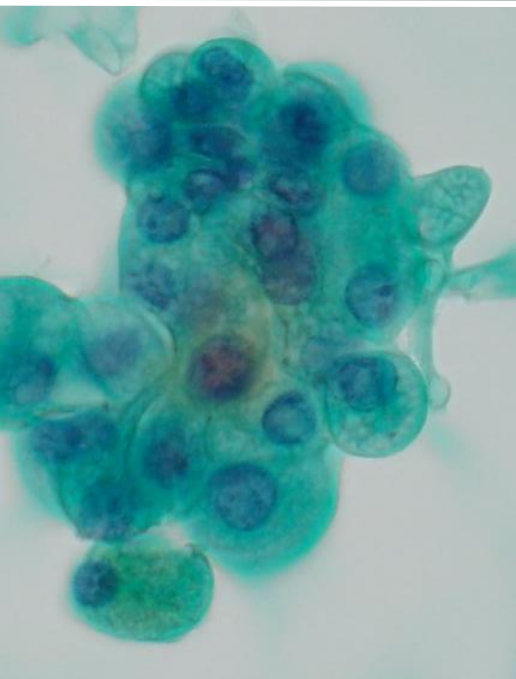
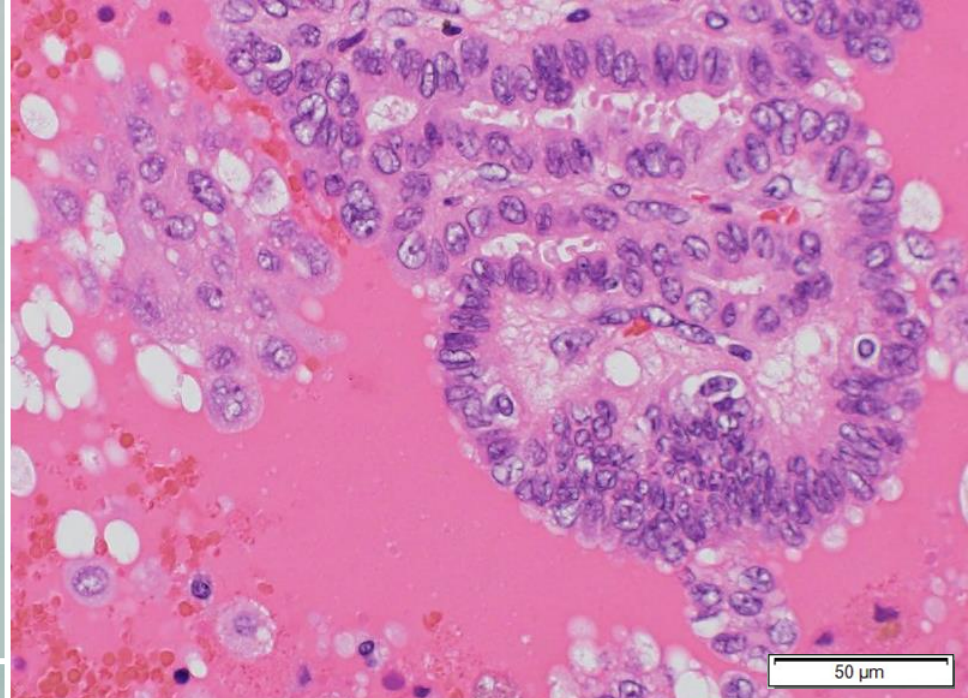
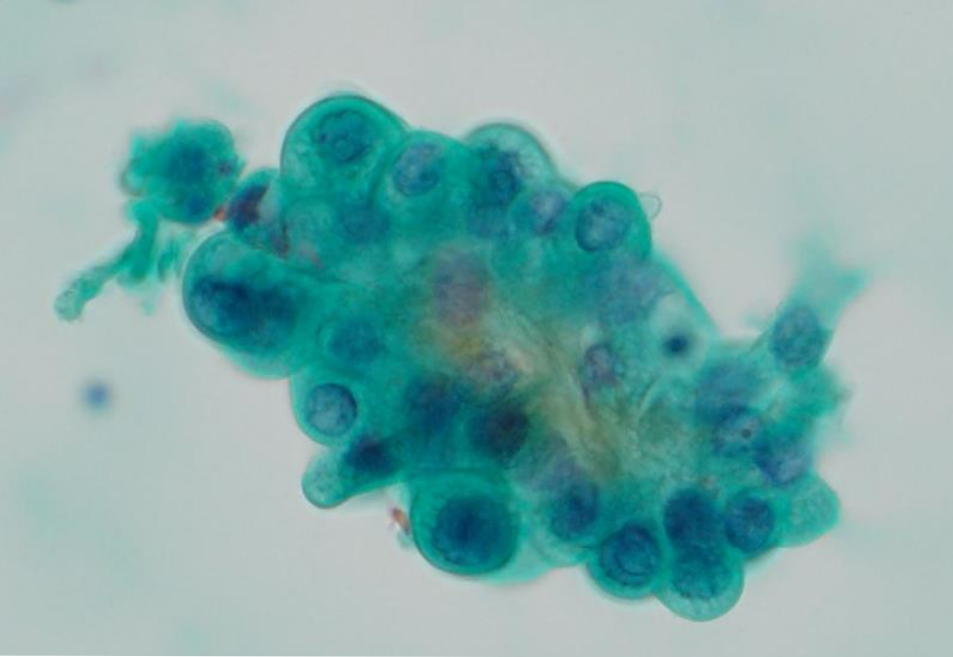


図7. 嚢胞形成を示す乳頭癌の細胞像および組織像

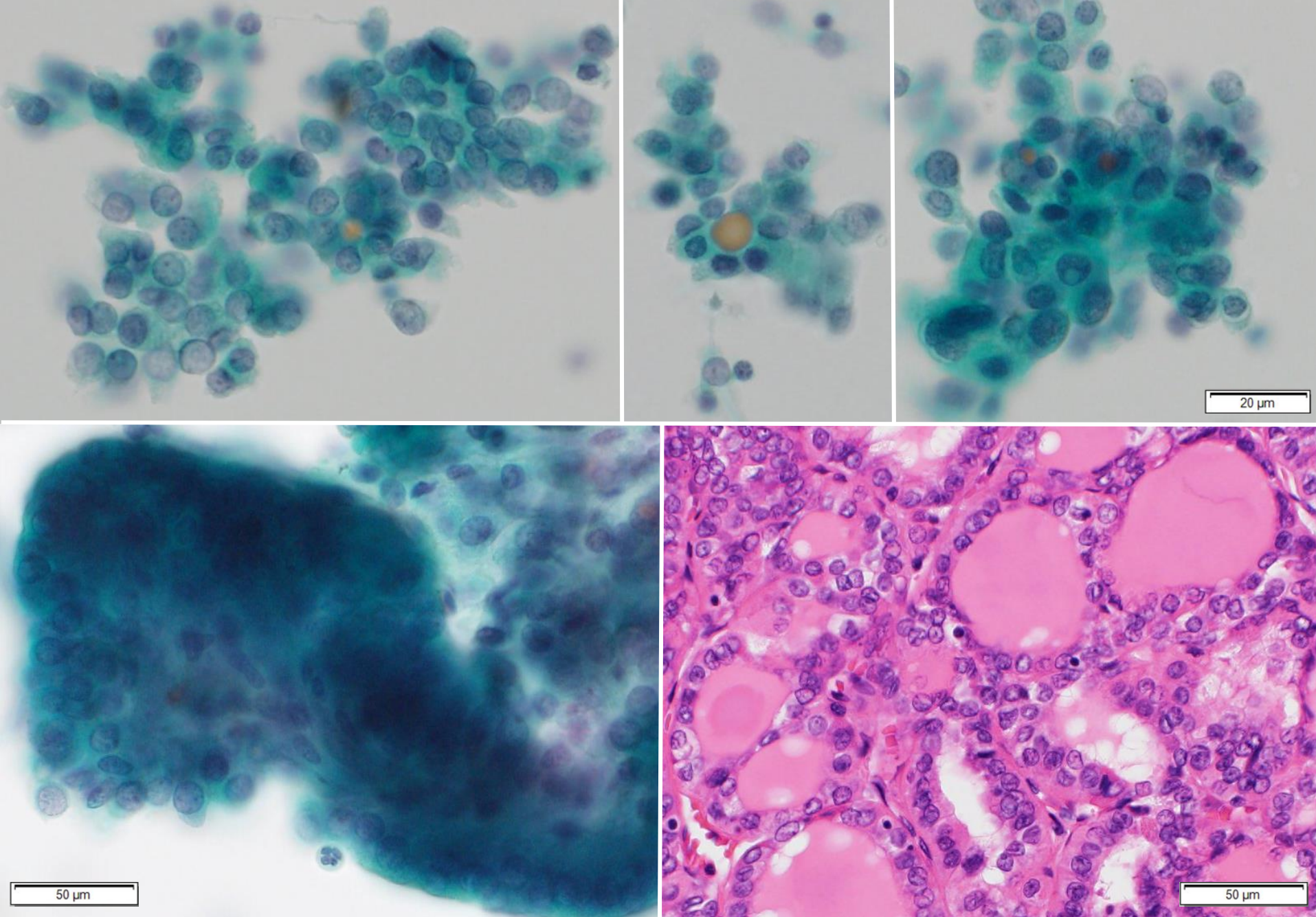


図8. 濾胞構造が主体であった乳頭癌の細胞像および組織像

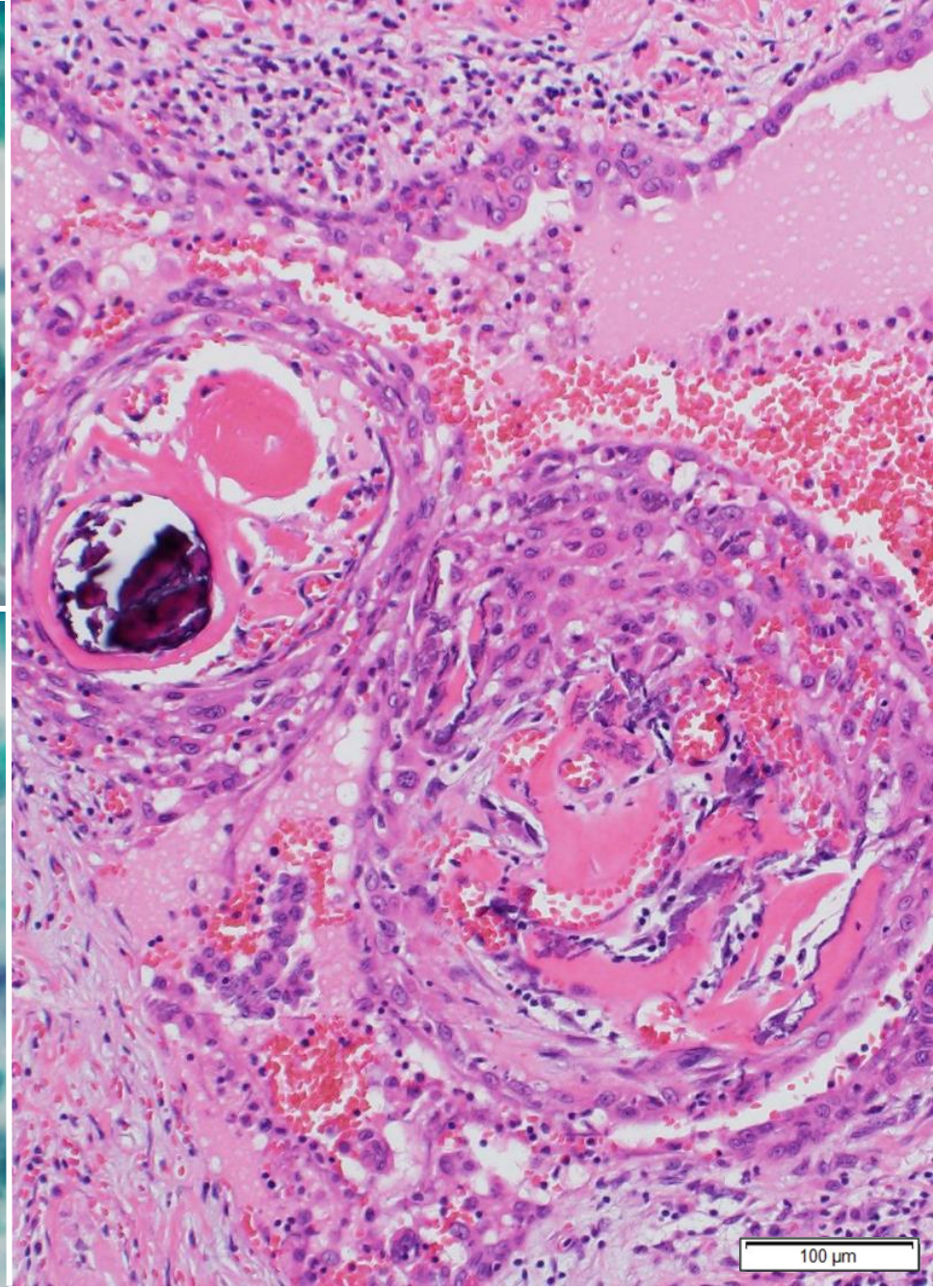
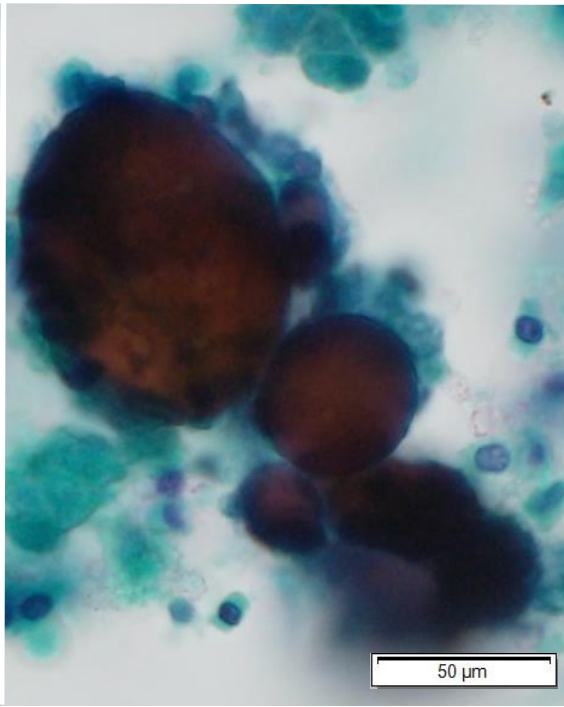
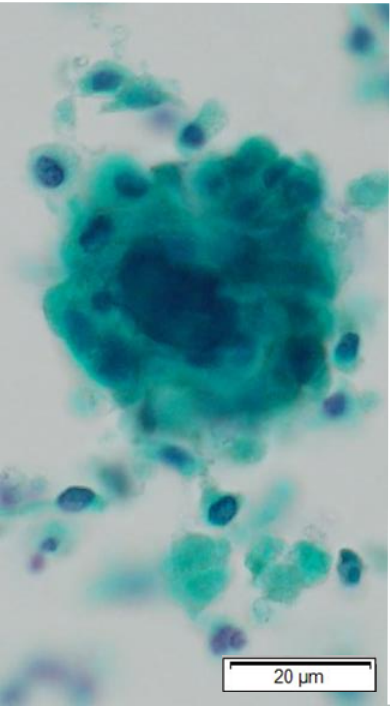
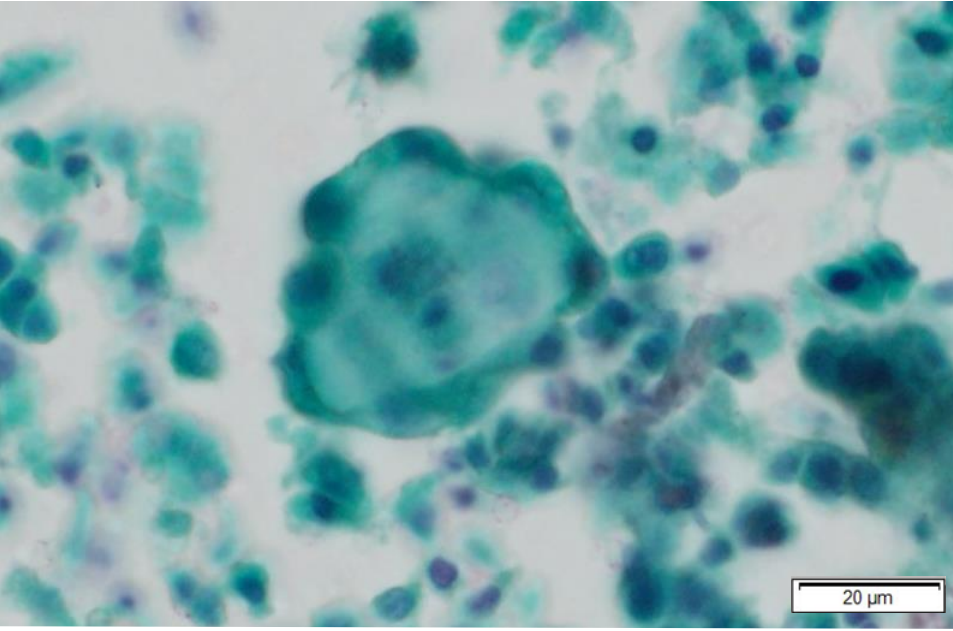


図9. びまん性硬化型乳頭癌の細胞像および組織像

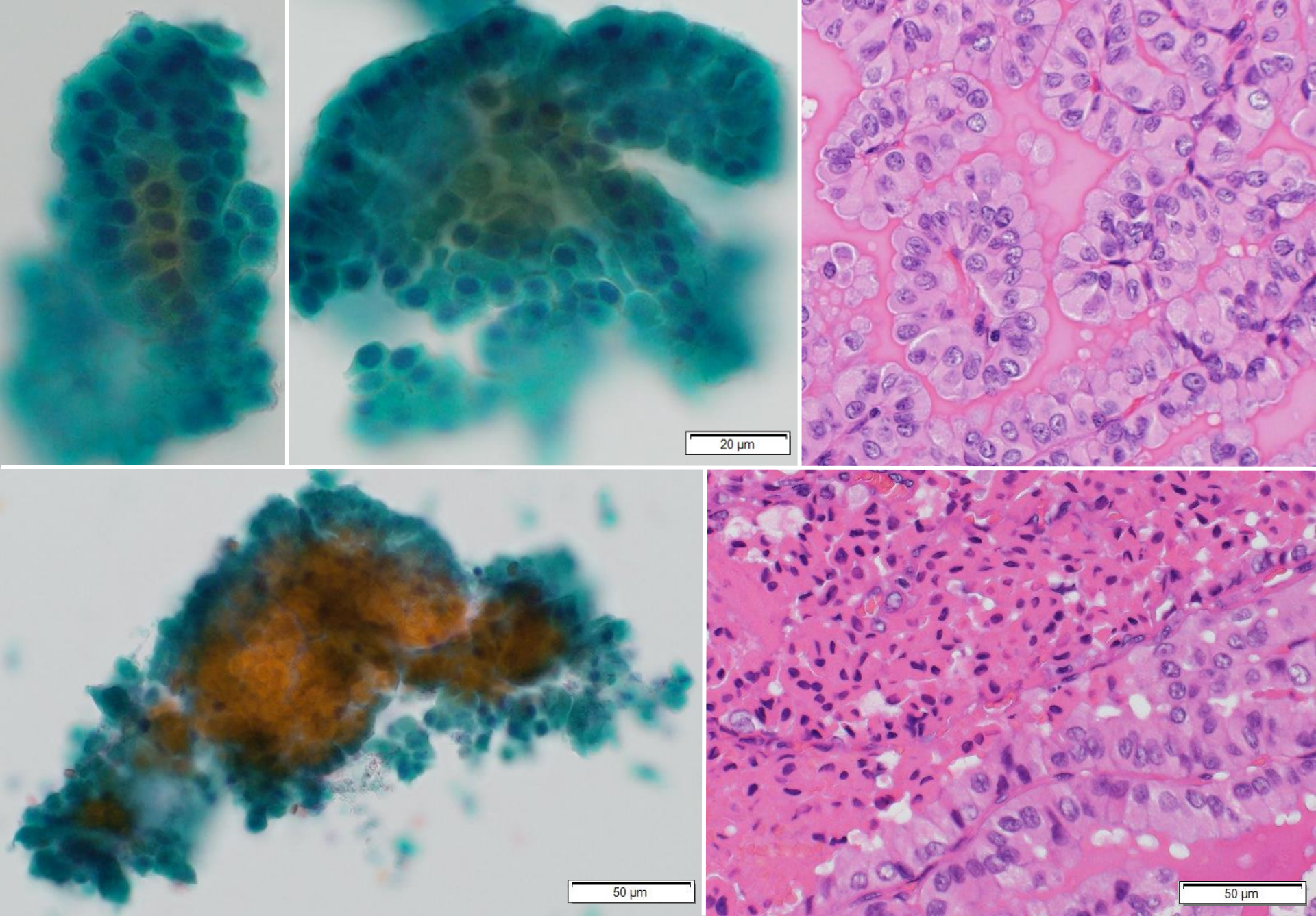


図10. 好酸性細胞型乳頭癌の細胞像および組織像

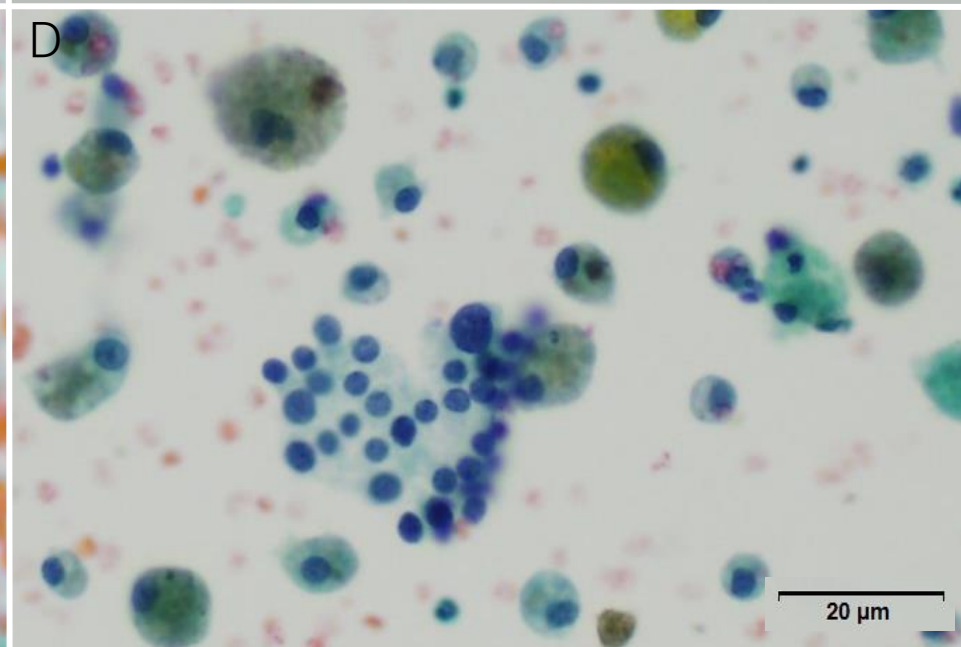
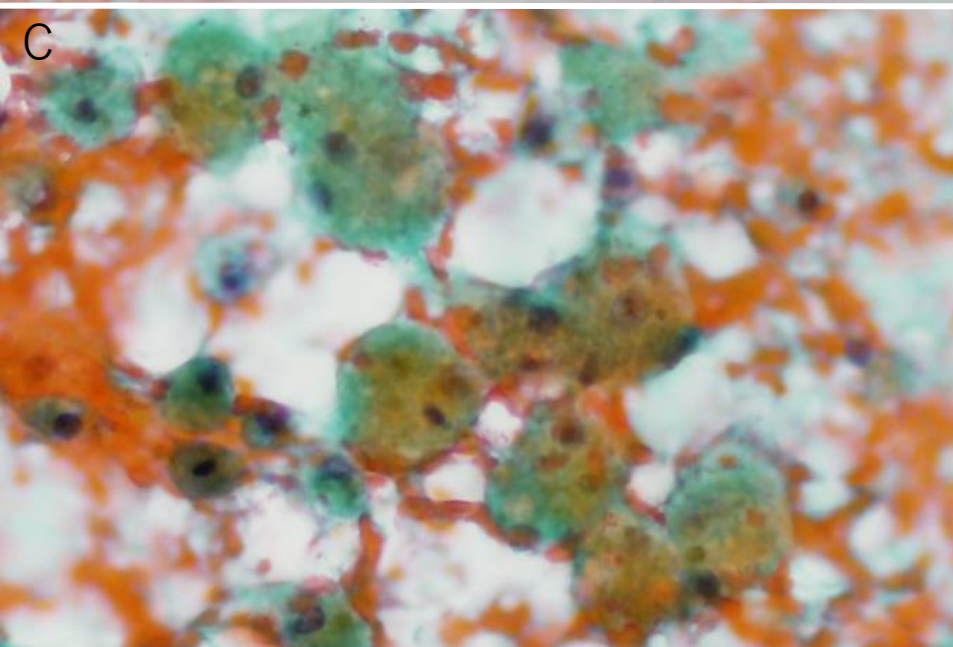
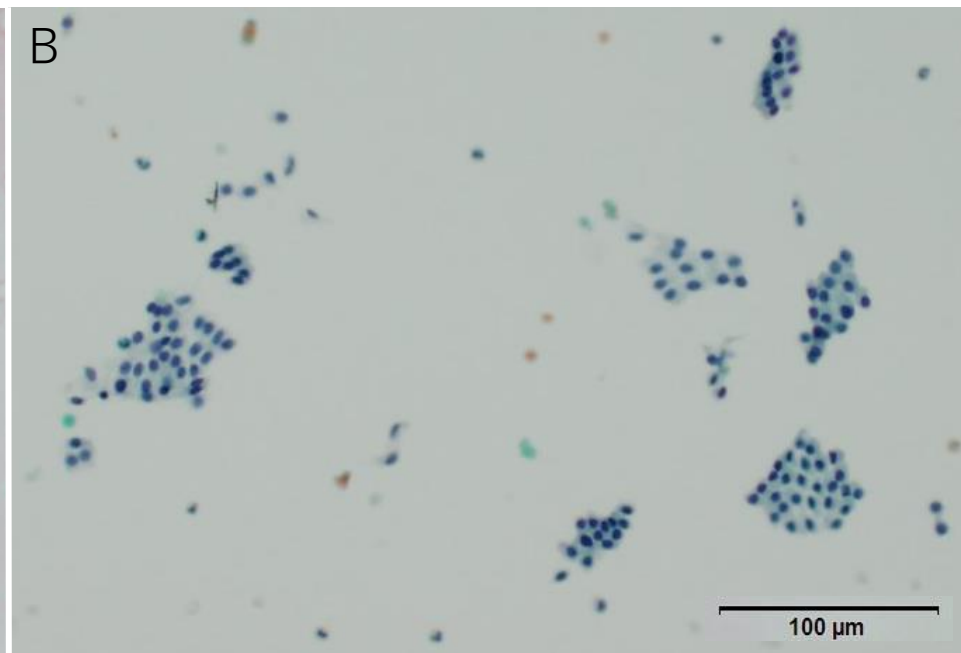
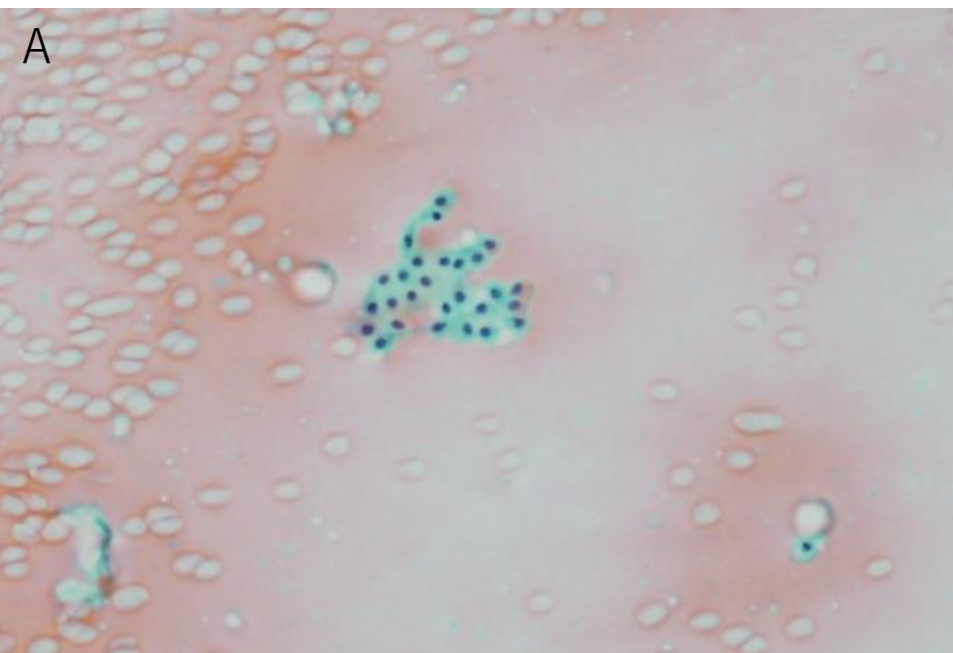


図11. 直接塗抹法とLBC法の細胞像（濾胞上皮細胞）

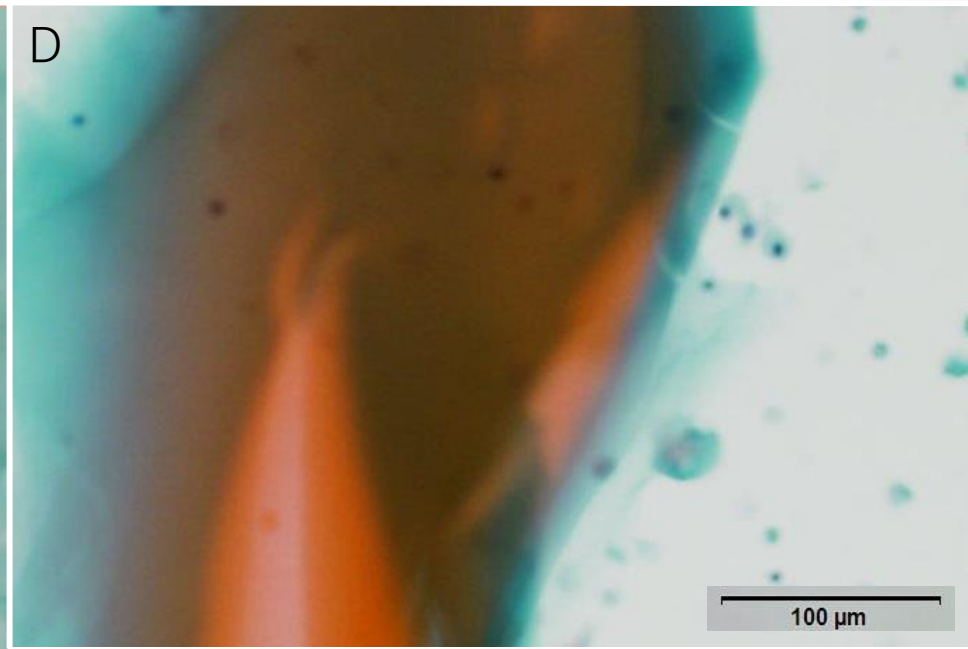
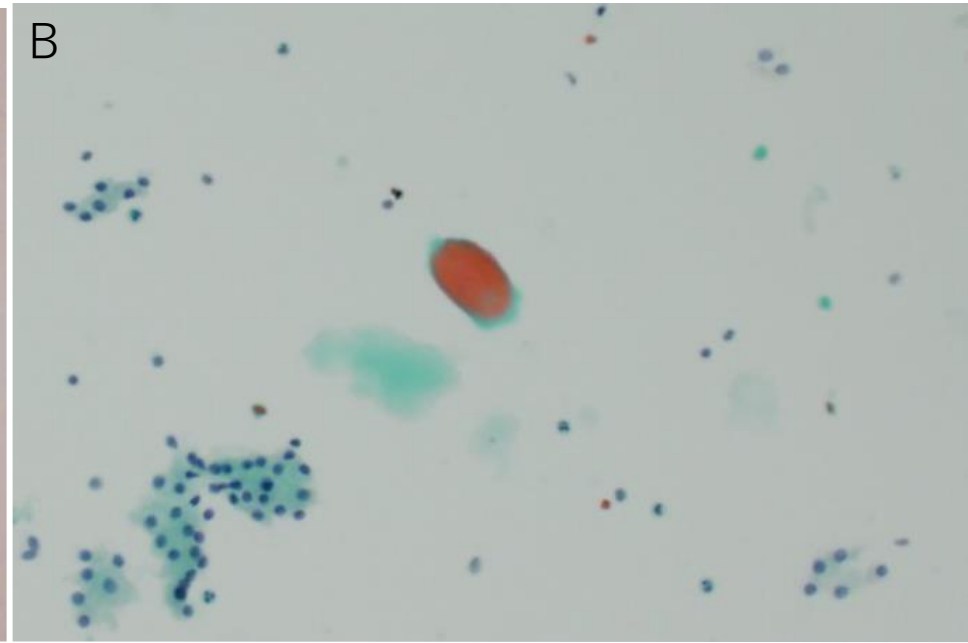
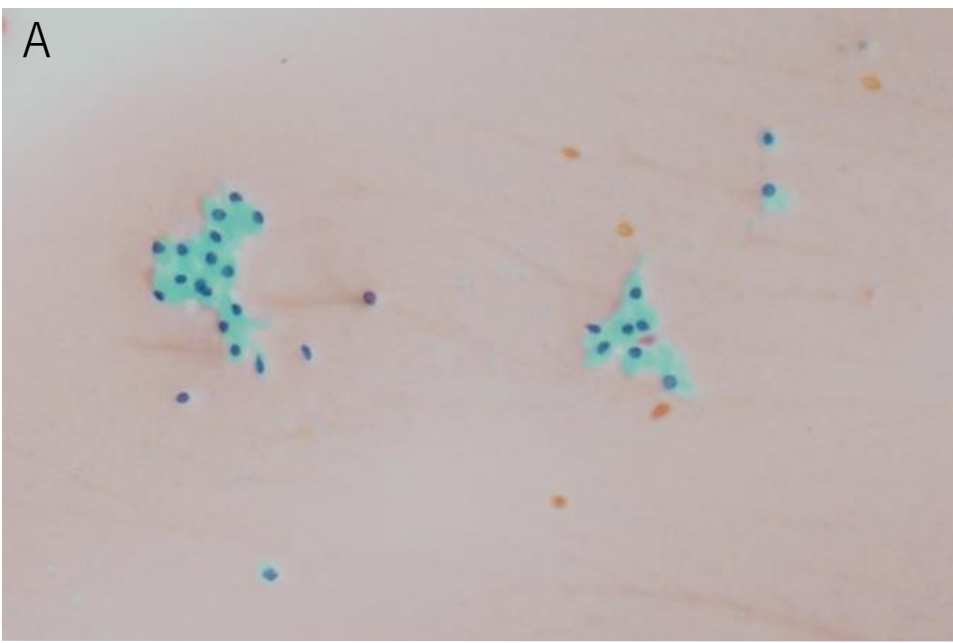


図12. 直接塗抹法とLBC法の細胞像（コロイド）

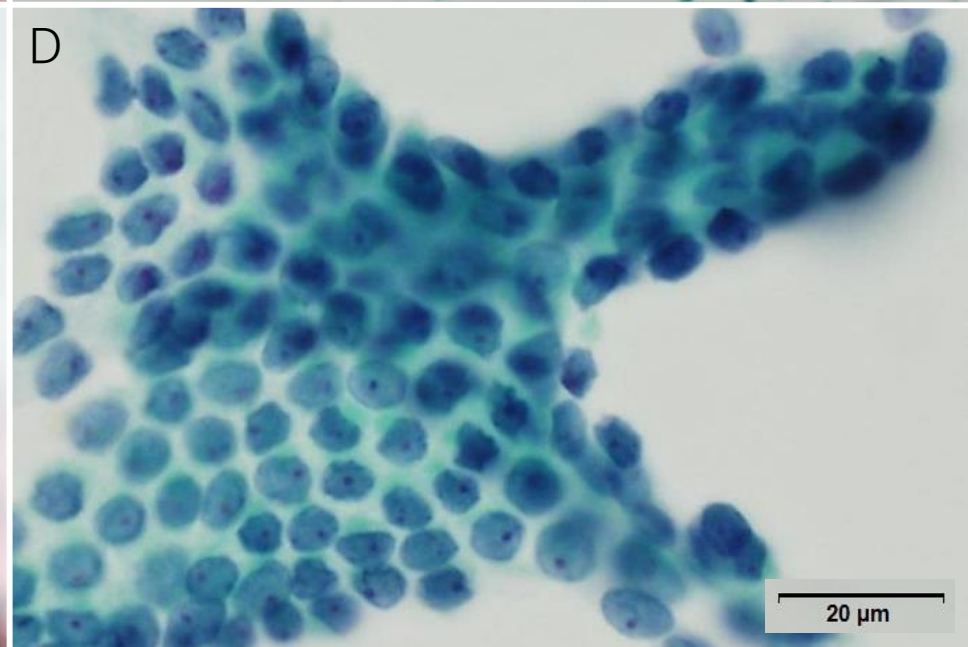
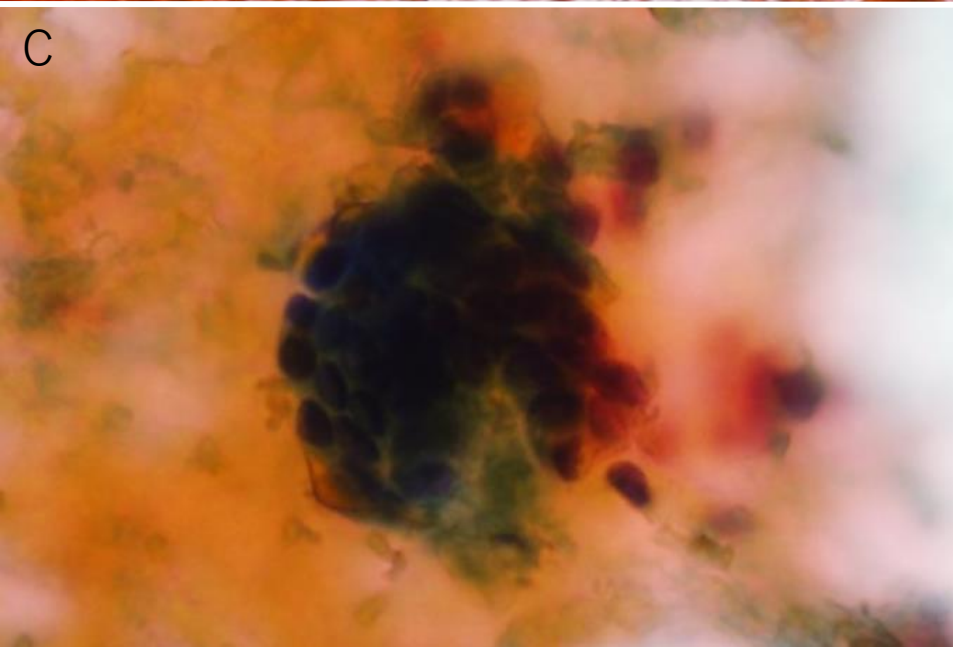
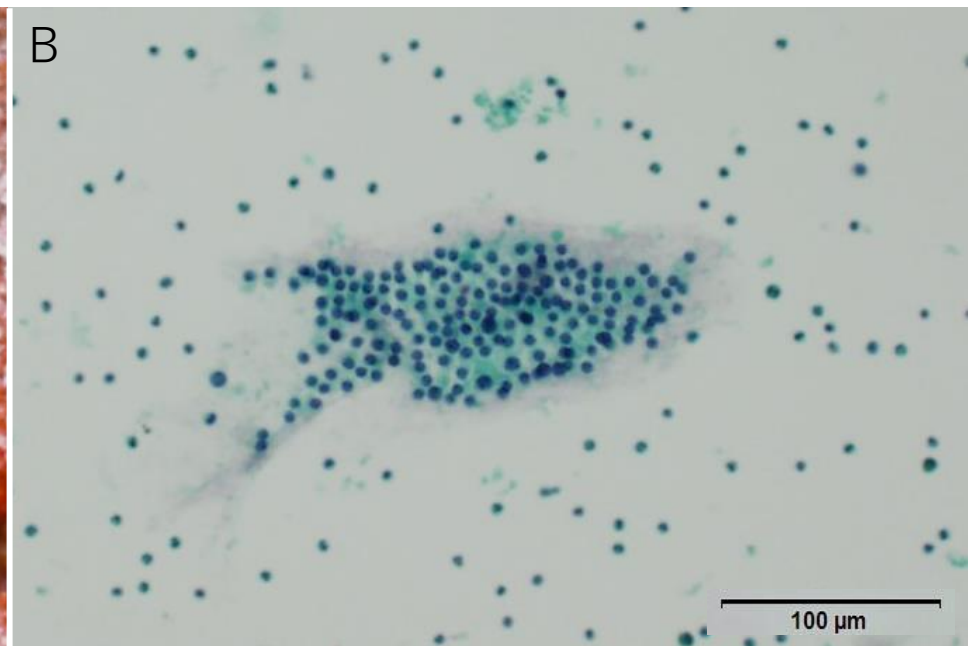
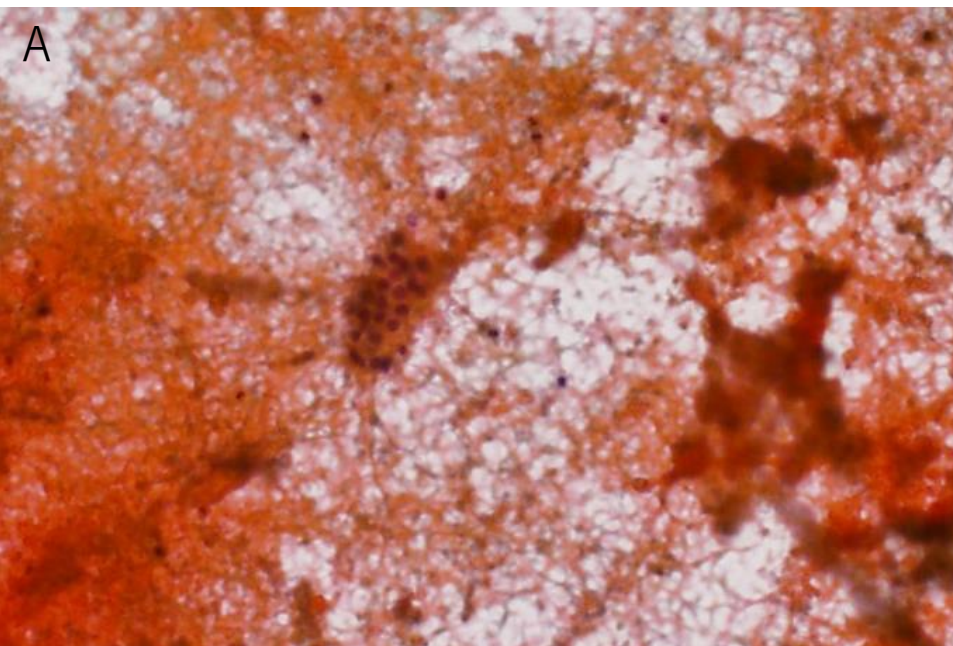


図13. 直接塗抹法とLBC法の細胞像（赤血球）

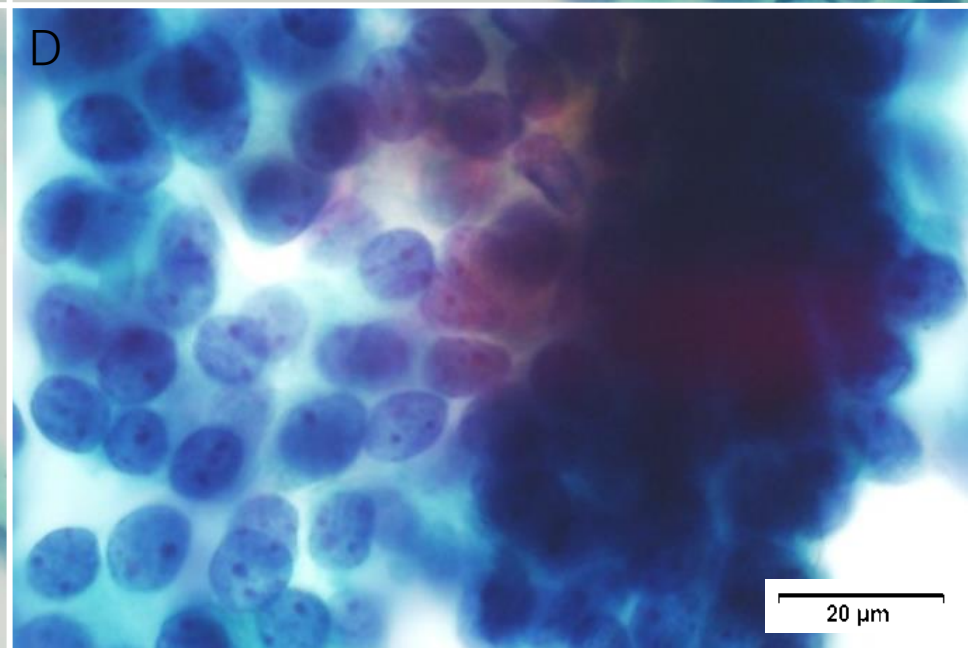
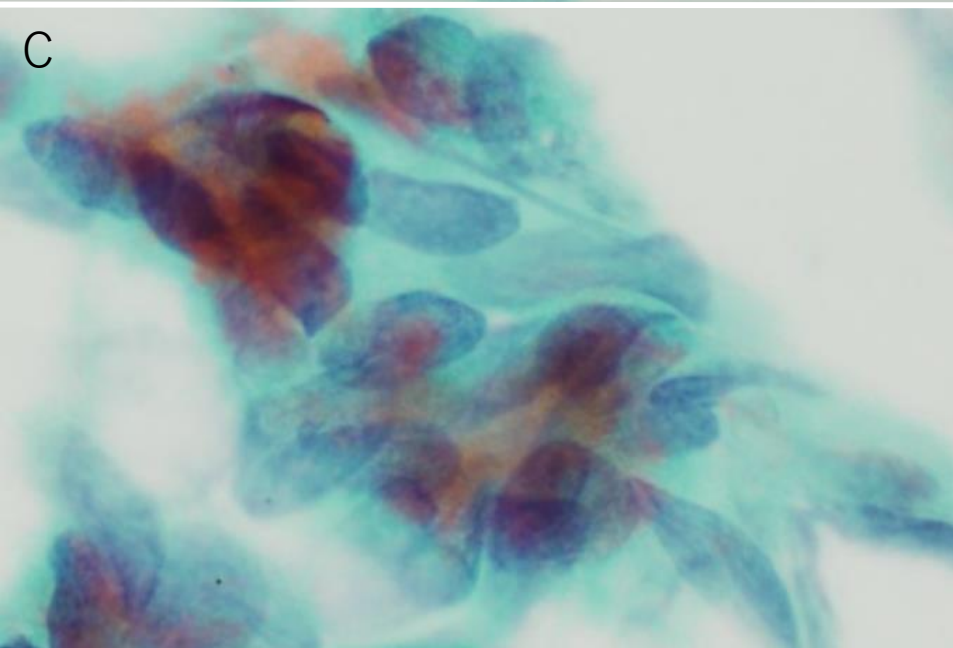
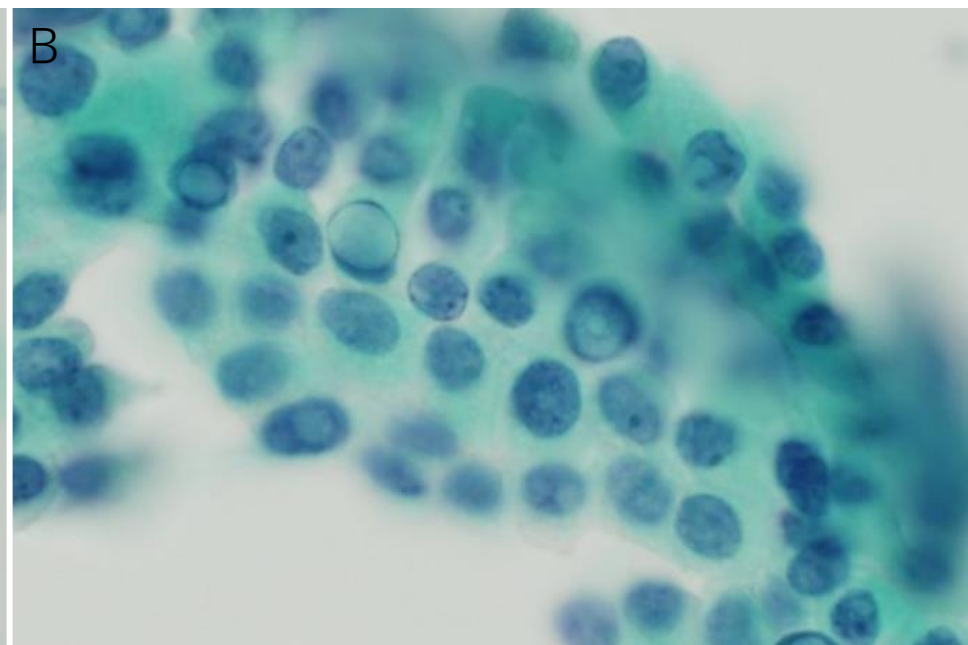
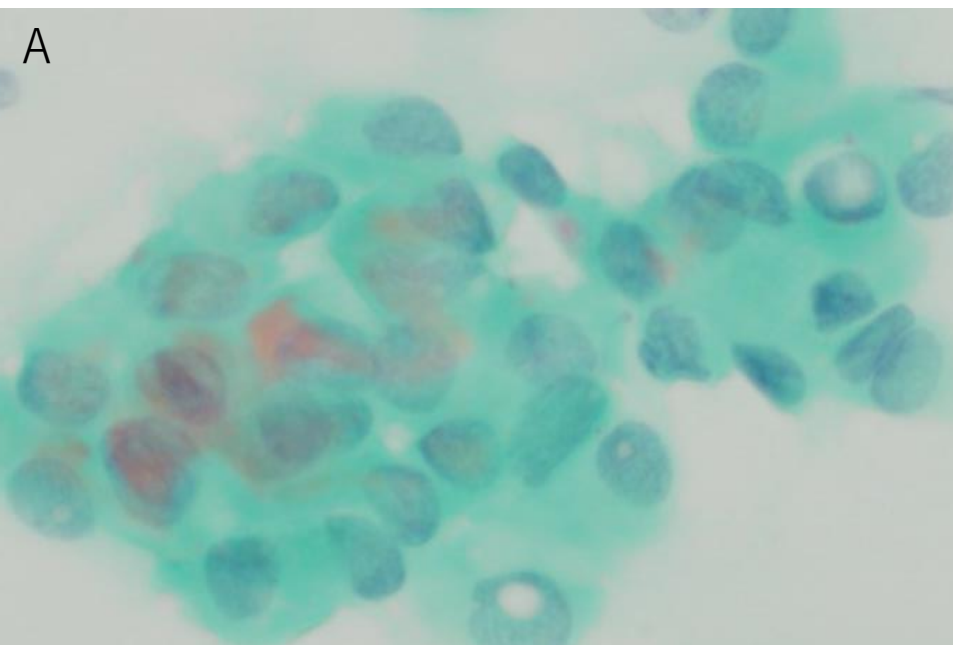
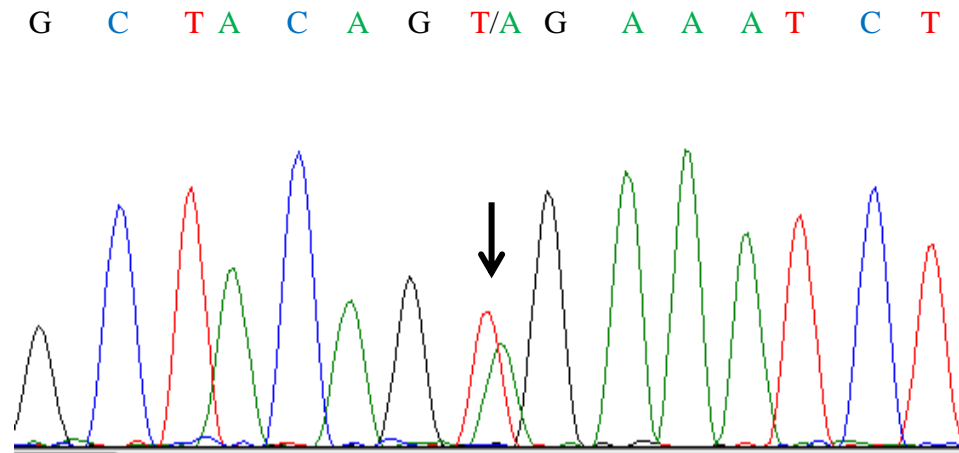
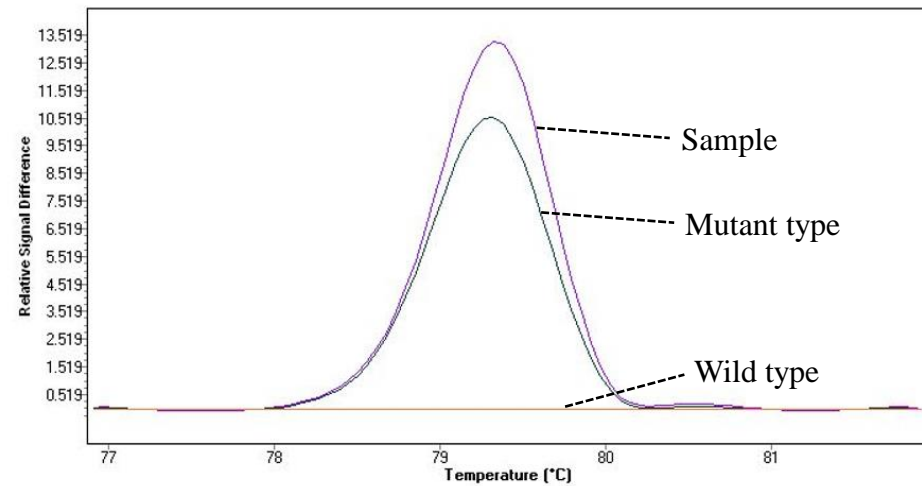
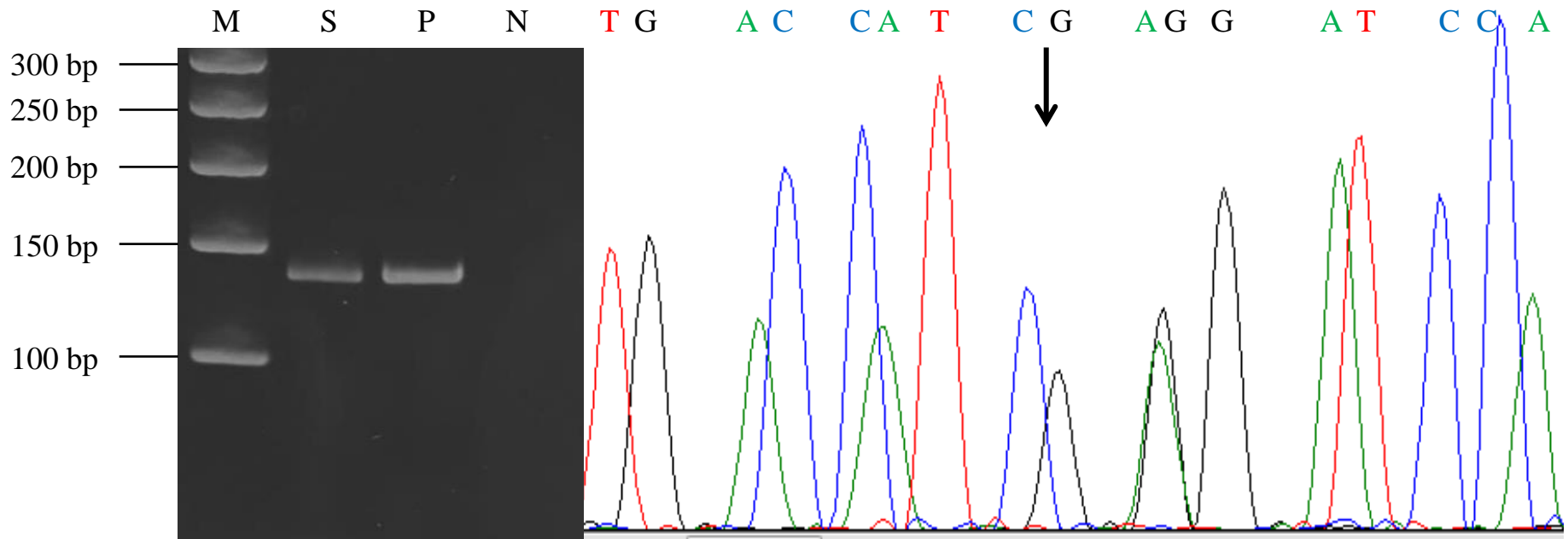


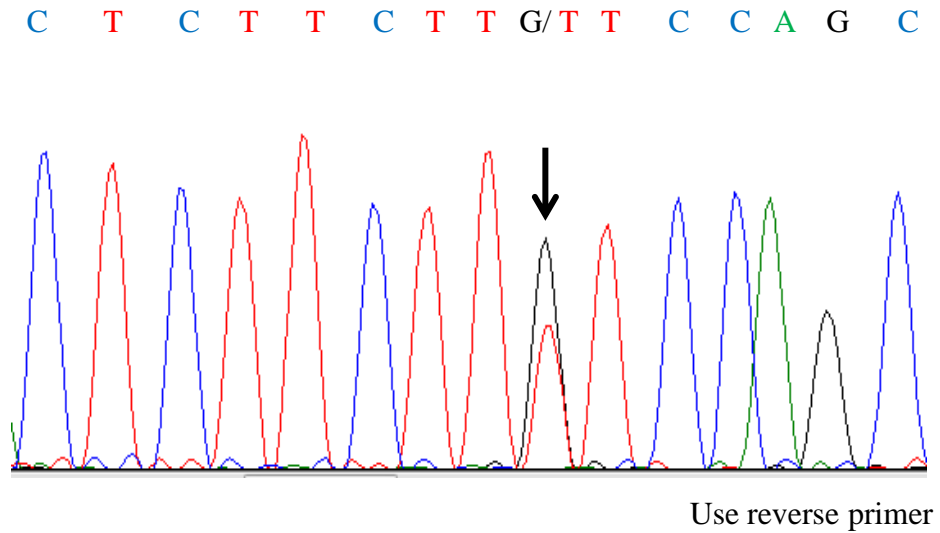
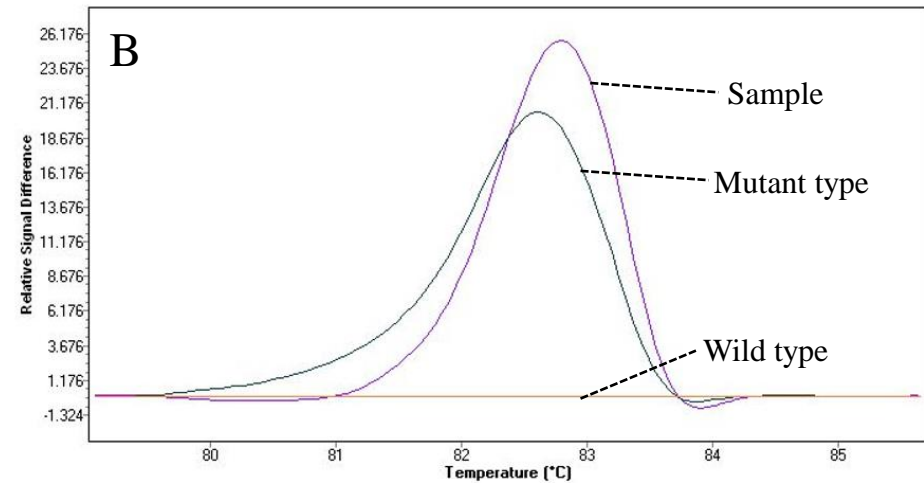
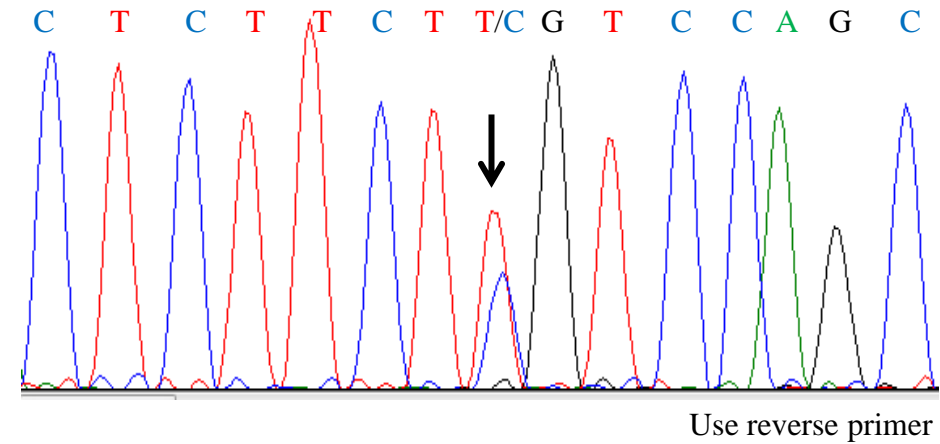
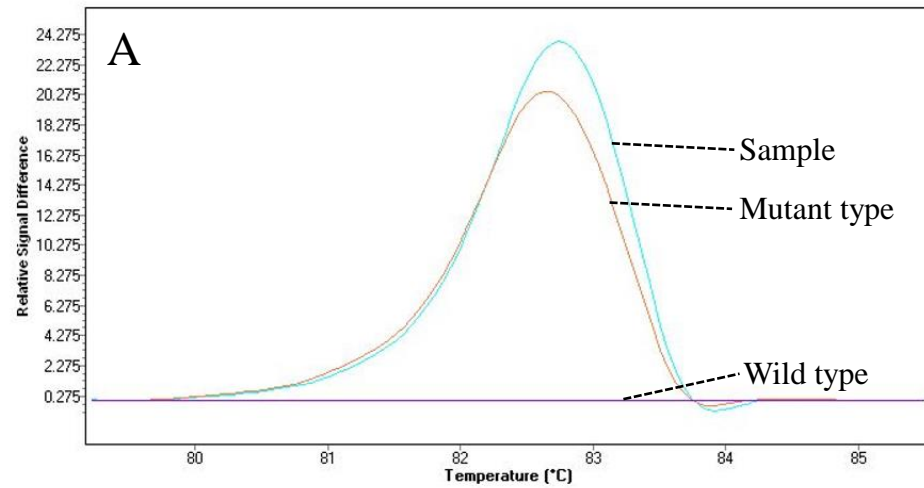
図14. 直接塗抹法とLBC法の細胞像（乾燥）



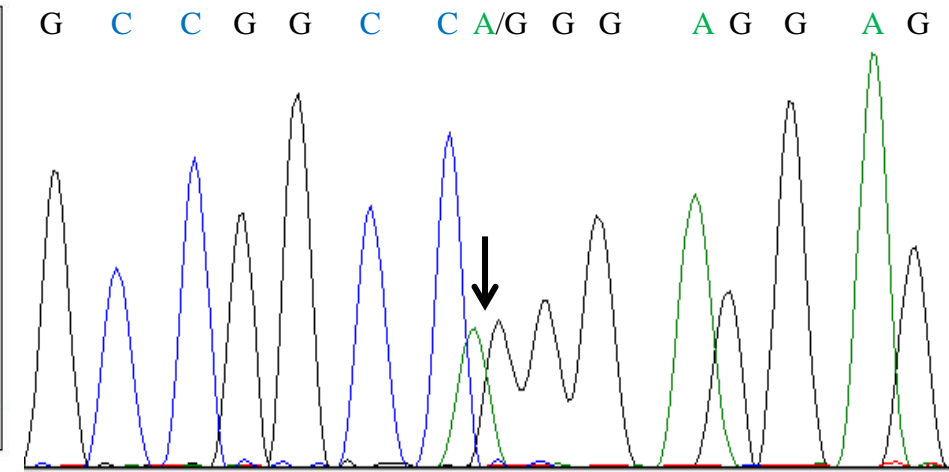
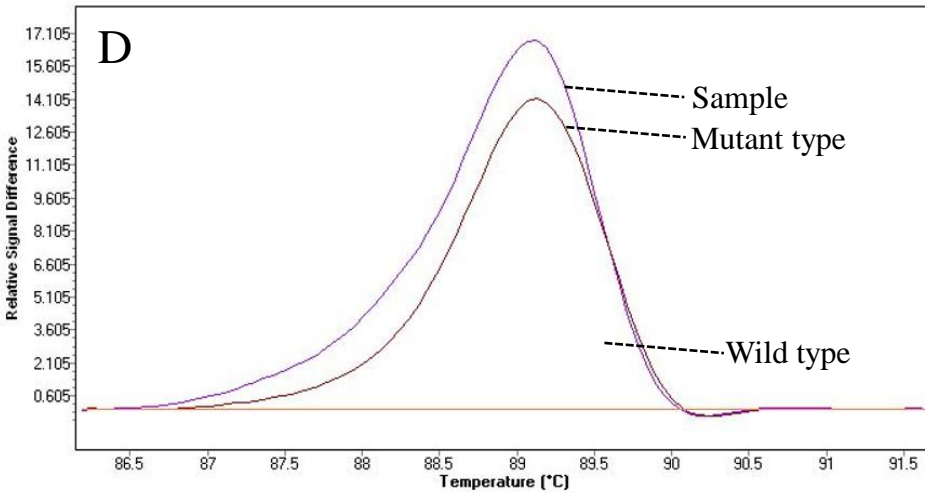
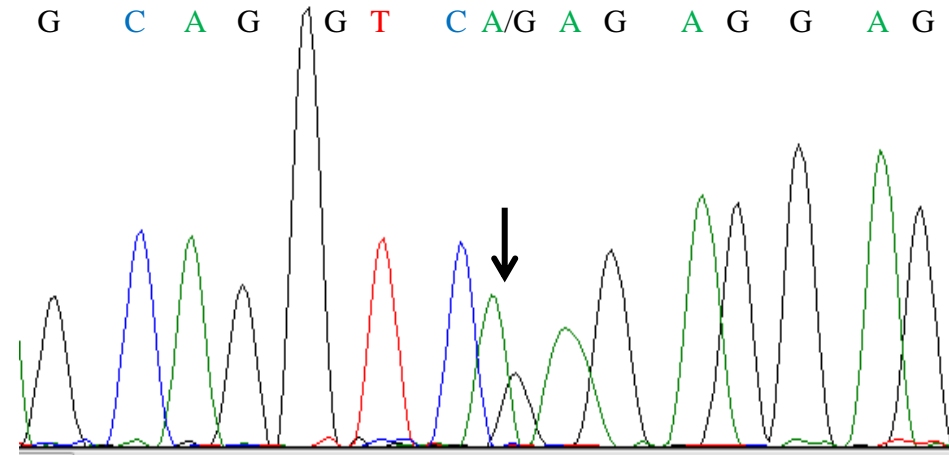
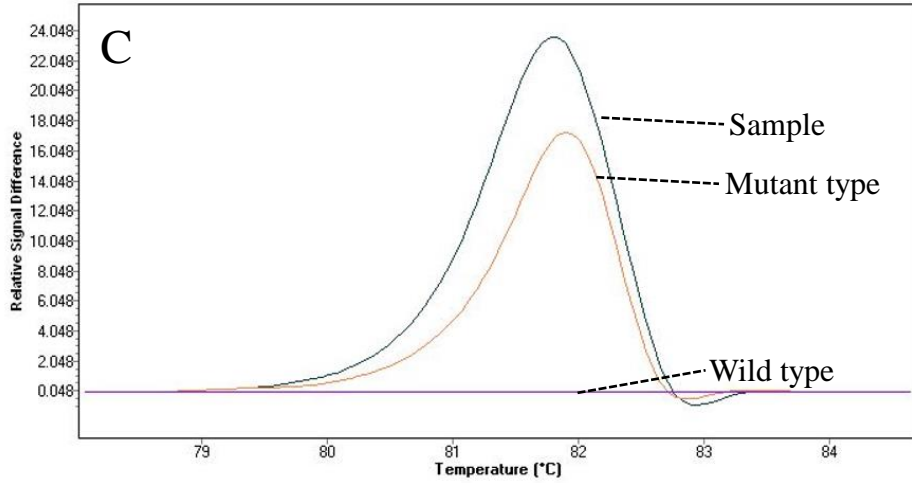
⊠15. Representative HRM and DNA sequencing result showed *BRAF* mutation in papillary carcinoma



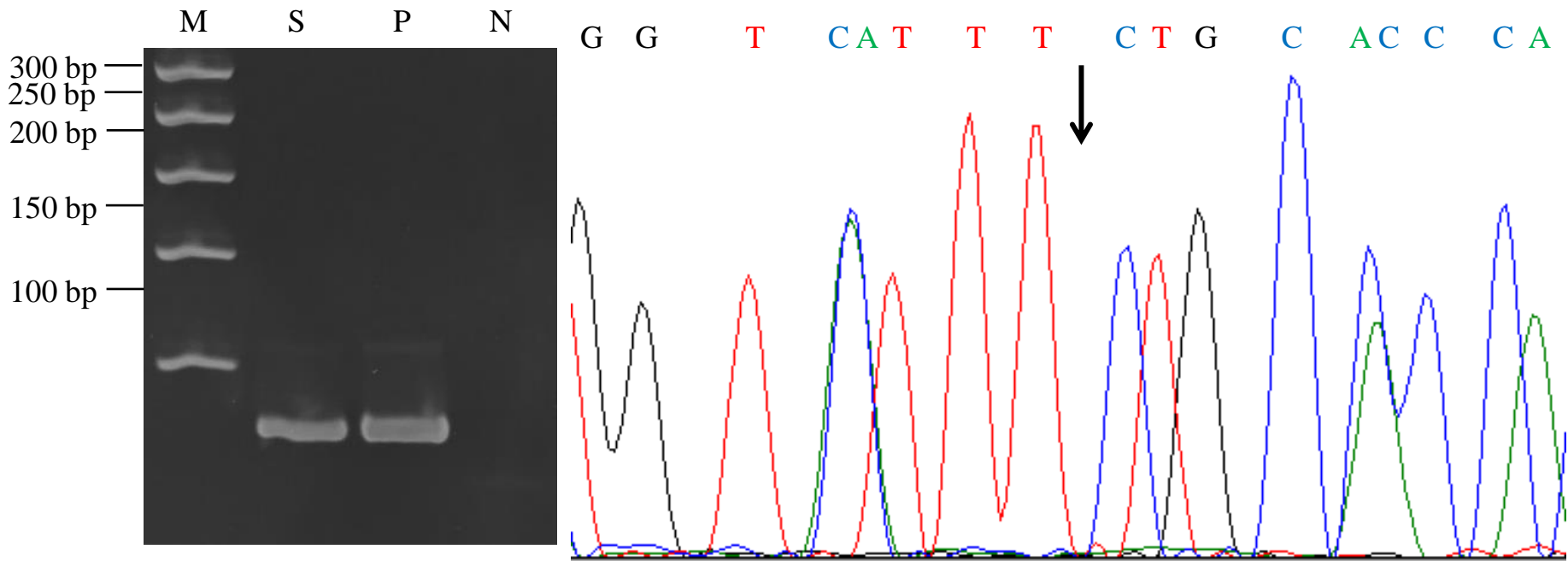
16. PCR and cDNA sequencing result of *RET/PTC1* rearrangement in papillary carcinoma



☒17. Representative HRM and DNA sequencing result of *RAS* mutations in follicular carcinomas



☒18. Representative HRM and DNA sequencing result of *RAS* mutations in follicular carcinomas



☒19. PCR and cDNA sequencing result of *PAX8/PPAR γ* rearrangement in follicular carcinoma

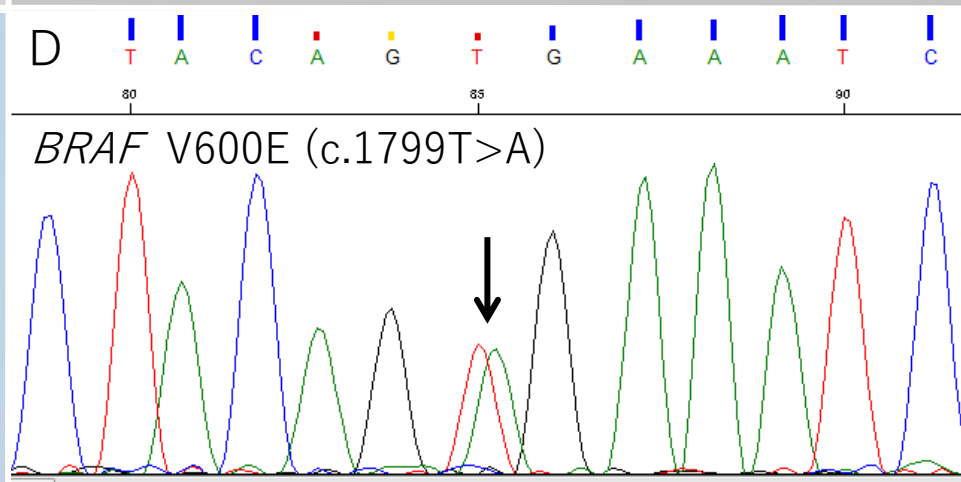
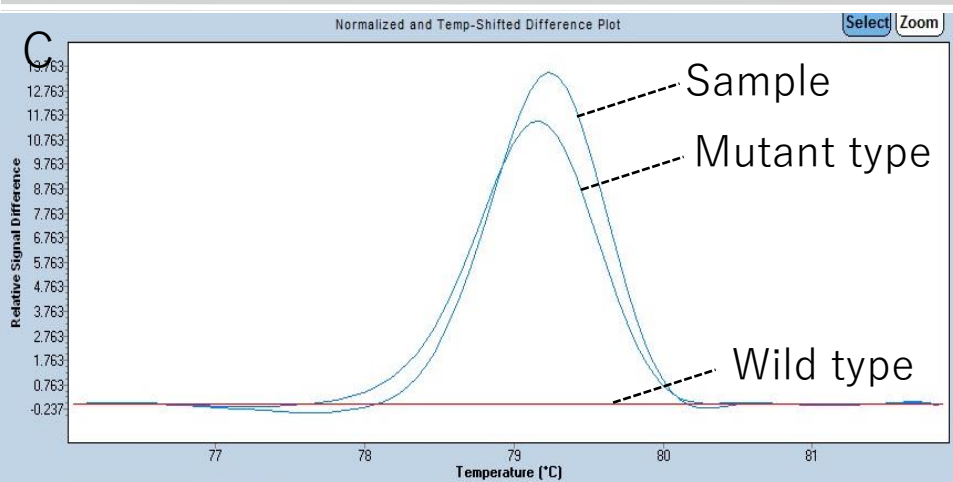
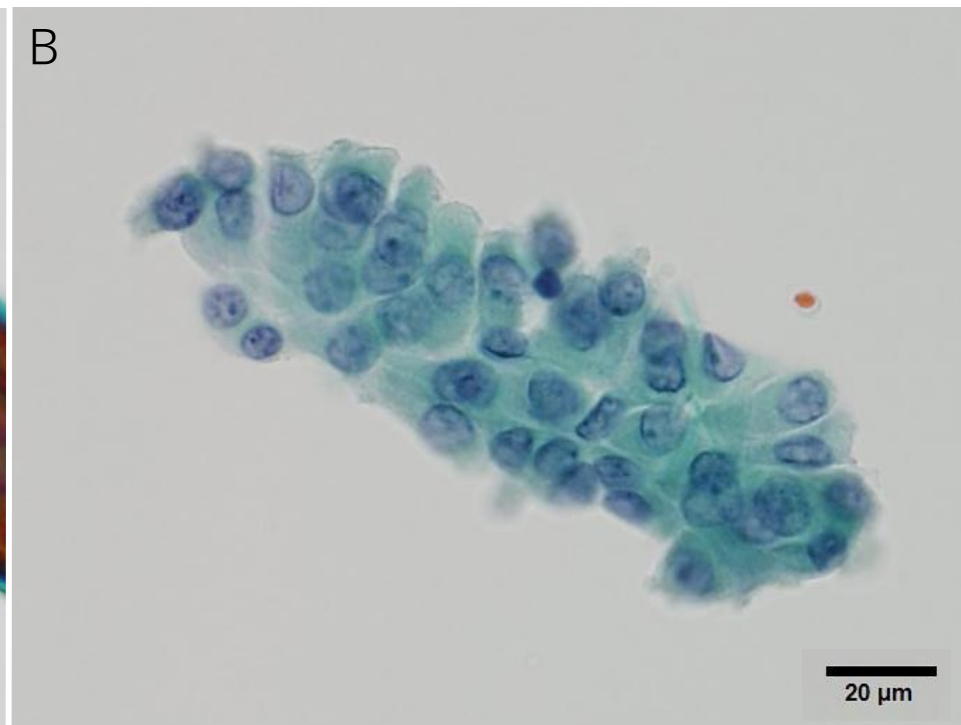
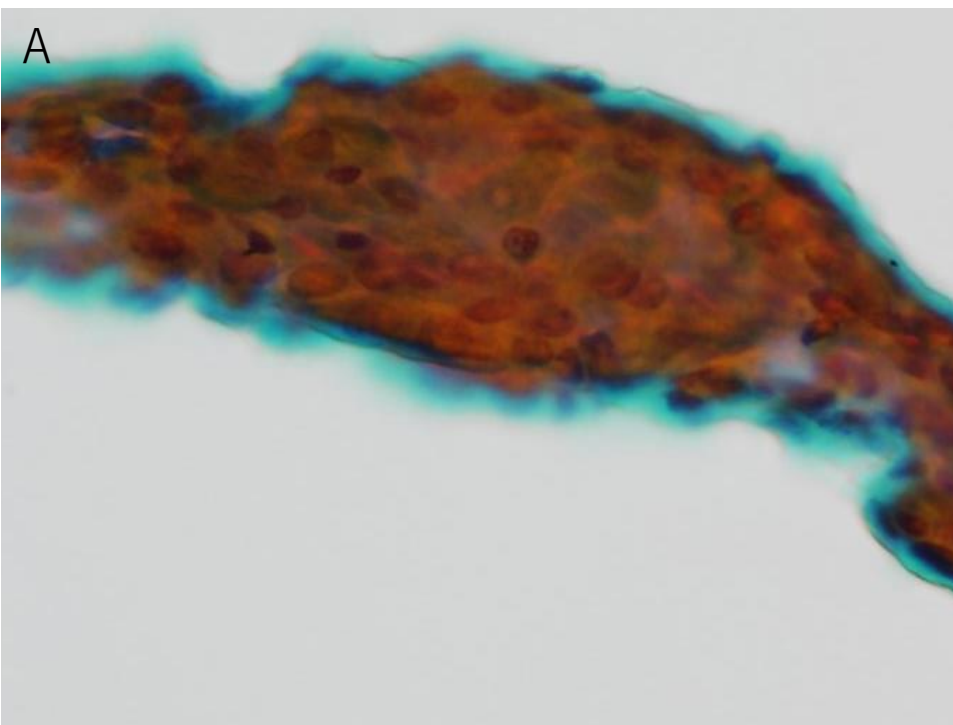
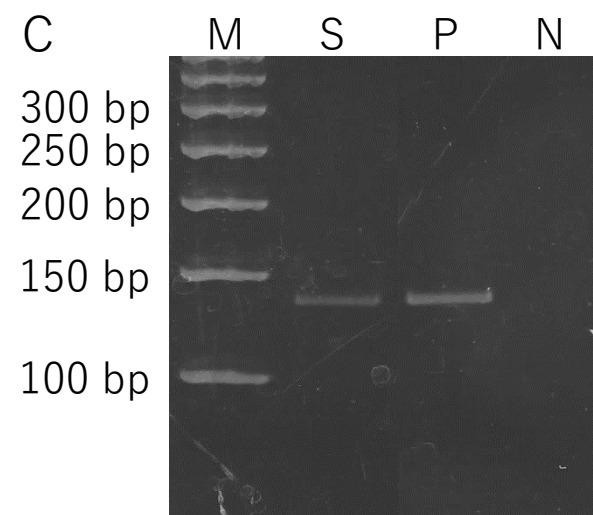
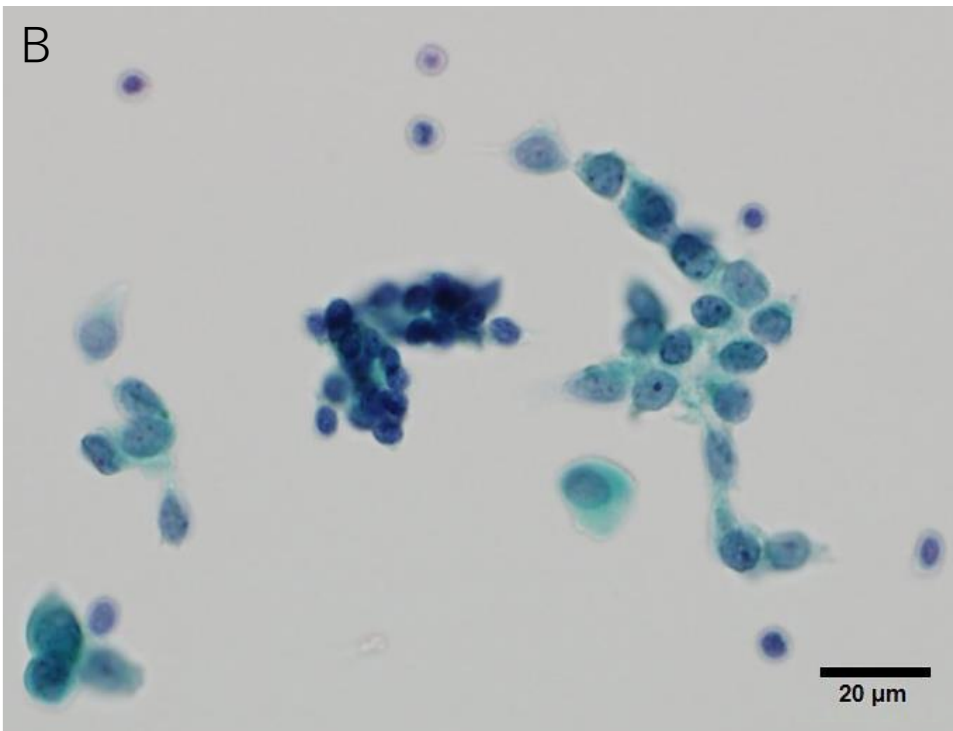
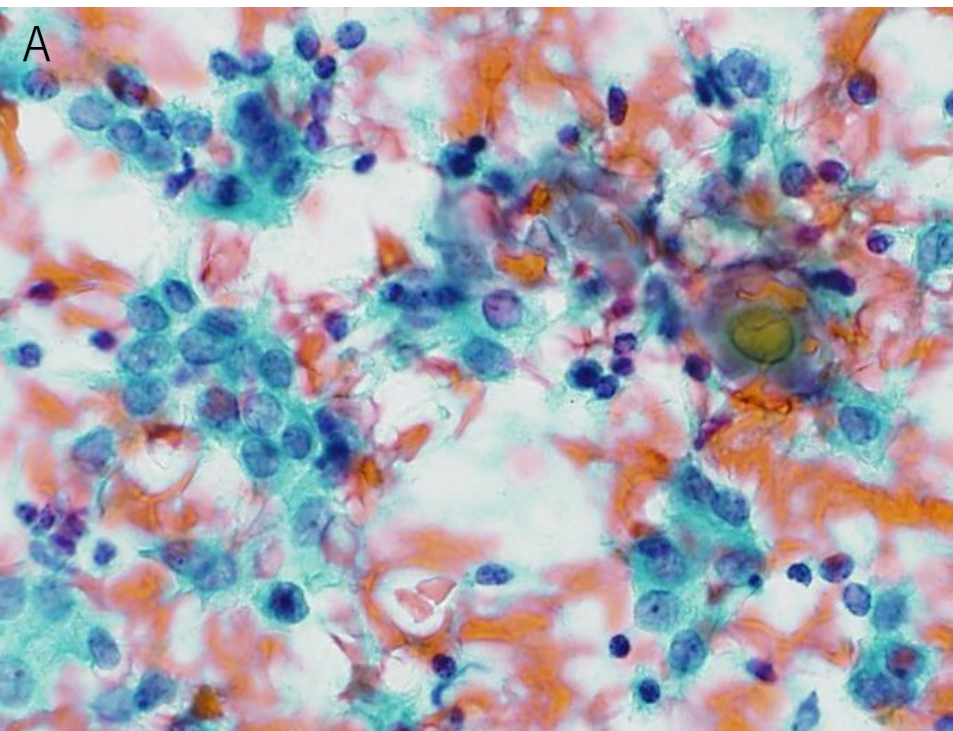


図20. 細胞診検体を用いた遺伝子検査 (症例1)



M: Marker
S: Sample
P: Positive control
N: Negative control

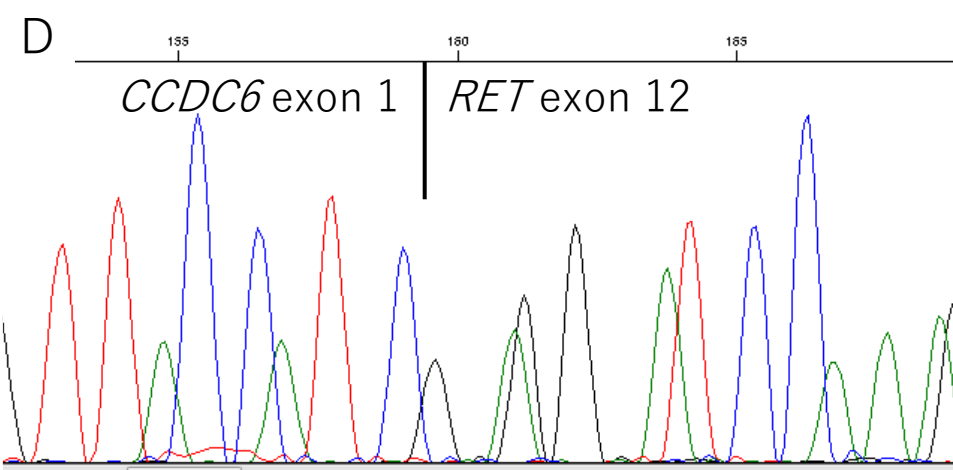


図21. 細胞診検体を用いた遺伝子検査 (症例2)

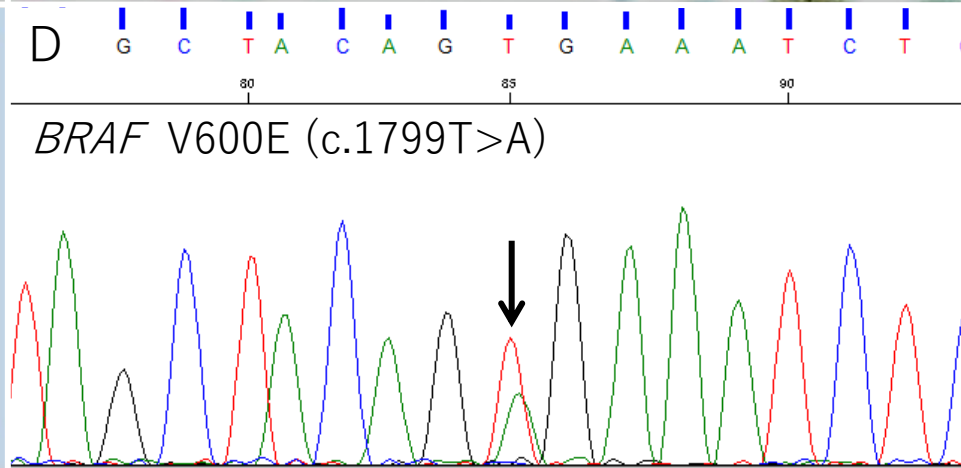
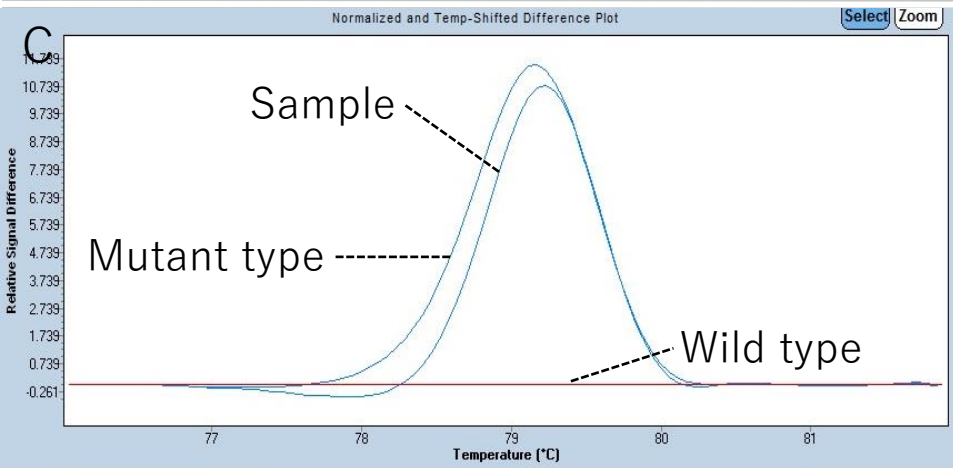
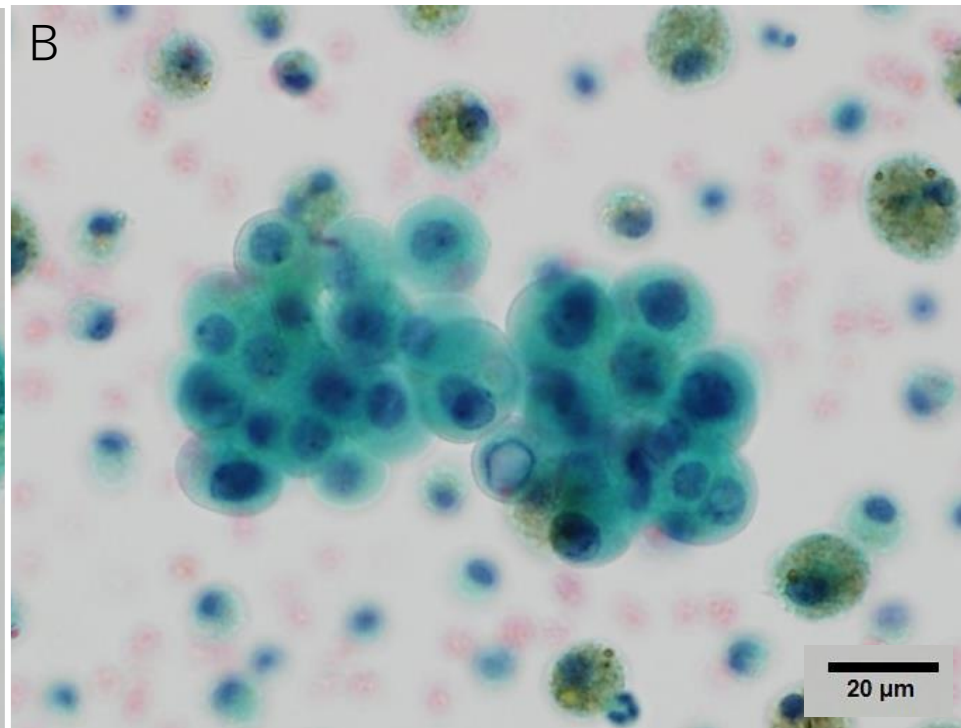
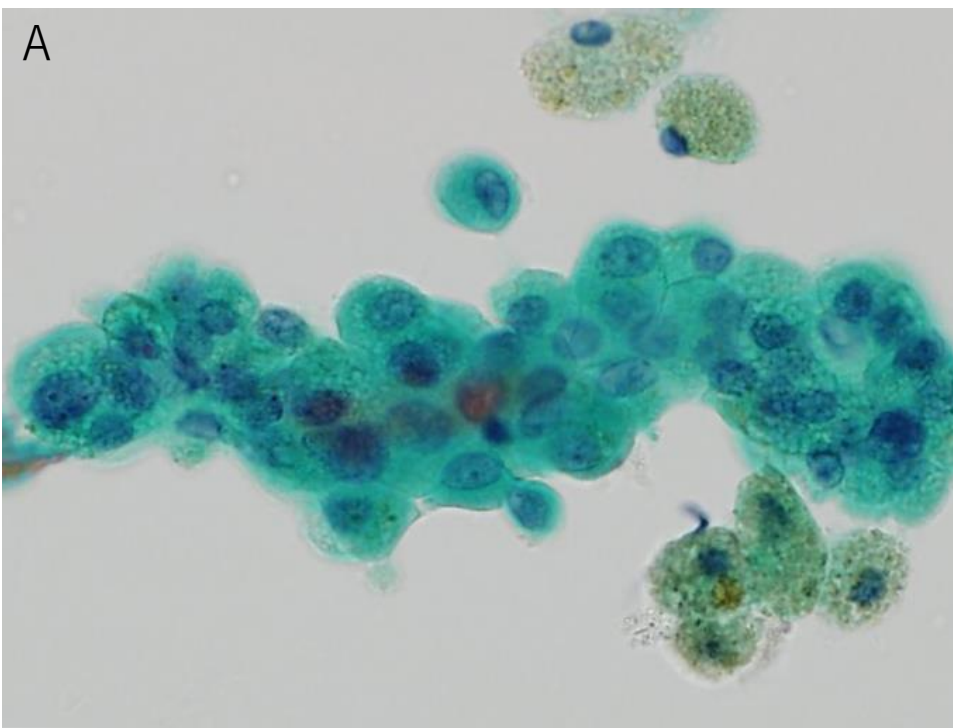


図22. 細胞診検体を用いた遺伝子検査 (症例3)

表1. 甲状腺穿刺吸引細胞診判定結果（2006～2013年、2275検体）

	判定	検体数	比率（％）
	検体不適正 (Inadequate)	258	11.3
	正常あるいは良性 (Normal or benign)	950	47.1
検体適正 (Adequate)	鑑別困難 (Indeterminate)	963	47.7
	悪性の疑い (Malignancy suspected)	36	1.8
	悪性 (Malignant)	68	3.4

表2. 濾胞性腫瘍と良性病変の細胞所見

	濾胞性腫瘍	好酸性細胞型 濾胞性腫瘍	良性病変
核腫大	中等度（リンパ球の2倍程度） ～高度、立体的	軽度～中等度	リンパ球の2倍を超えない
重積性	不規則、3層以上の重なり	平面的～不規則	規則的、平面的
核間距離	不均等 (核が重なり、狭い部分あり)	広い～核が少し重なる	均等 広い～核が少し重なる
結合性	やや低下（疎～保持）	低下 (散在性細胞が多い)	強固
多彩性	なし	なし（好酸性細胞）	あり
細胞量	多い	多い	少
囊胞所見	なし	ない>あり	あり

表3. 鑑別困難例の再判定結果（2006～2013年、963検体）

判定		検体数	
検体不適正 (Inadequate)		3	
正常あるいは良性 (Normal or benign)		773	
鑑別困難 (Indeterminate)	意義不明 良性病変疑い	83	187
	良悪性鑑別困難	35	
	濾胞性腫瘍疑い 濾胞性腫瘍	69	

表4. 鑑別困難例再判定後の判定比率（2006～2013年、2275検体）

判定	検体数	比率（％）
検体不適正 (Inadequate)	261	11.4
<hr/>		
検体適正 (Adequate)		
正常あるいは良性 (Normal or benign)	1723	85.5
鑑別困難 (Indeterminate)	187	9.3
悪性の疑い (Malignancy suspected)	36	1.8
悪性 (Malignant)	68	3.4

表5. 濾胞腺腫・濾胞癌症例の再判定結果（2006～2013年）

	組織診断	細胞診再判定結果
1	Follicular adenoma	意義不明・良性病変疑い
2	Follicular adenoma (oxyphilic variant)	濾胞性腫瘍
3	Follicular adenoma (oxyphilic variant)	濾胞性腫瘍
4	Follicular adenoma (oxyphilic variant)	濾胞性腫瘍
5	Follicular carcinoma	意義不明・良性病変疑い
6	Follicular carcinoma	良悪性鑑別困難
7	Follicular carcinoma	濾胞性腫瘍
8	Follicular carcinoma	濾胞性腫瘍

表6. 判定基準変更後の判定結果（2014年4月～2016年11月）

	判定	検体数	比率（％）
	検体不適正 (Inadequate)	43	13.0
	正常あるいは良性 (Normal or benign)	233	80.6
検体適正 (Adequate)	鑑別困難 (Indeterminate)	32	11.1
	悪性の疑い (Malignancy suspected)	4	1.4
	悪性 (Malignant)	20	6.9

表7. 細胞診判定と組織診断の比較（2014年4月～2016年11月、38症例）

細胞診判定	組織診断	症例数
正常あるいは良性	No malignancy	2
	Basedow's disease	1
	Adenomatous nodule (Adenomatous goiter)	10
	Follicular adenoma	1
	Papillary carcinoma	4
鑑別困難	No malignancy	1
	Adenomatous nodule (Adenomatous goiter)	1
	Follicular adenoma	1
	Follicular carcinoma	1
	Poorly differentiated carcinoma	1
	Papillary carcinoma	2
	Malignant lymphoma	1
悪性の疑い	Adenomatous goiter (Adenomatous nodule)	1
	Malignant lymphoma	1
悪性	Papillary carcinoma	9
	Undifferentiated (anaplastic) carcinoma	1

表8. 新報告様式による判定結果（2006～2013年、2275検体）

	判定	検体数	比率 (%)
	検体不適正 (Unsatisfactory)	261	11.4
	良性または嚢胞液 (Benign or Cyst Fluid)	1723	85.5
	意義不明 (Undetermined Significance)	118	5.9
検体適正	濾胞性腫瘍 (Follicular Neoplasm)	69	3.4
	悪性の疑い (Suspicious for Malignancy)	36	1.8
	悪性 (Malignant)	68	3.4

表9. 新報告様式による判定結果（2014年4月～2016年11月、332検体）

	判定	検体数	比率 (%)
	検体不適正 (Unsatisfactory)	43	13.0
	良性または嚢胞液 (Benign or Cyst Fluid)	233	80.6
	意義不明 (Undetermined Significance)	17	5.9
検体適正	濾胞性腫瘍 (Follicular Neoplasm)	15	5.2
	悪性の疑い (Suspicious for Malignancy)	4	1.4
	悪性 (Malignant)	20	6.9

表10. 2010～2015年に手術が施行された甲状腺検体（172例）

組織診断	症例	細胞診実施例
Papillary carcinoma	91	85 (93.4%)
Follicular carcinoma	3	3 (100%)
Poorly differentiated carcinoma	3	3 (100%)
Undifferentiated (anaplastic) carcinoma	2	1 (50%)
Malignant lymphoma	3	2 (66.7%)
Follicular adenoma	2	2 (100%)
Follicular tumor with cystic degeneration	1	1 (100%)
Adenomatous nodule (Adenomatous goiter)	51	41 (80.4%)
Basedow's disease	12	2 (16.7%)
Thyroiditis	2	0 (0%)
No malignancy	2	1 (50%)
Total	172	16 (96.5%)

表11. 乳頭癌症例の細胞診判定 (2010~2015年、85例)

細胞診判定		症例
検体適正 Adequate	検体不適正 Inadequate	3 (3.5%)
	正常あるいは良性 Normal or benign	18 (21.2%)
	鑑別困難 Indeterminate	7 (8.2%)
	悪性の疑い Malignancy suspected	13 (15.3%)
	悪性 Malignant	44 (51.8%)
		28 (32.9%)
		57 (67.1%)

表12. 鑑別困難例の再鏡検結果

症例	過小評価の理由	再判定	組織との比較
1	異型細胞少数	鑑別困難	通常型
2	異型細胞少数、核所見不十分	鑑別困難	通常型
3	化生変化、核所見不十分	悪性の疑い	嚢胞形成
4	核所見不十分、濾胞構造あり	悪性	濾胞構造主体
5	核所見不十分	悪性	通常型
6	化生変化	悪性	通常型
7	化生変化、核所見不十分	悪性	通常型

表13. 正常あるいは良性、不適正例の再鏡検結果

細胞診判定	再判定	組織との比較	症例
正常あるいは良性	良性	偶発癌	6
		石灰化、硝子化著明	2
		嚢胞形成	1
	通常型	5	
	鑑別困難	嚢胞形成	2
		好酸性細胞型	1
不適正	悪性の疑い	びまん性硬化型	1
		石灰化、硝子化著明	1
	不適正	通常型	2

表14. 直接塗抹法単独、LBC法単独、直接塗抹法とLBC法を併せた細胞診判定結果

判定	直接塗抹法	LBC法	直接塗抹法 +LBC法
検体不適正	315 (27.9%)	77 (6.8%)	69 (6.1%)
<hr/>			
検体適正			
嚢胞液	214 (26.3%)	206 (19.6%)	183 (17.3%)
良性	437 (53.8%)	638 (60.7%)	662 (62.5%)
意義不明	78 (9.6%)	96 (9.1%)	96 (9.1%)
濾胞性腫瘍	28 (3.4%)	45 (4.3%)	51 (4.8%)
悪性の疑い	10 (1.2%)	5 (0.5%)	5 (0.5%)
悪性	46 (5.7%)	61 (5.8%)	62 (5.9%)

表15. List of primers used for PCR and sequence analysis

Primer	Primer sequences (5'-3')
<i>BRAF</i> exon 15	Forward: ATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGA Reverse: ATCCAGACAACCTGTTCAAACCT
<i>NRAS</i> exon 2	Forward: ACAGGTTCTTGCTGGTGTGA Reverse: CACTGGGCCTCACCTCTATG
<i>NRAS</i> exon 3	Forward: TGGTGAAACCTGTTTGTGG Reverse: CCTTTCAGAGAAAATAATGCTCCT
<i>KRAS</i> exon 2	Forward: AAGGCCTGCTGAAAATGACTG Reverse: GGTCCTGCACCAGTAATATGCA
<i>KRAS</i> exon 3	Forward: CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCA Reverse: CTCATGTACTGGTCCCTCATTG
<i>HRAS</i> exon 2	Forward: GAGACCCTGTAGGAGGACCC Reverse: GGGGTCGTATTCGTCCACAA
<i>HRAS</i> exon 3	Forward: CTCCTGCAGGATTCCTACCG Reverse: TGATGGCAAACACACACAGG
<i>RET/PTC1</i>	Forward: GGAGACCTACAAACTGAAGTGCAA Reverse: CCCTTCTCCTAGAGTTTTTCCAAGA
<i>RET/PTC3</i>	Forward: CCAGTGGTTATCAAGCTCCTTACA Reverse: GGGAATTCCCACCTTTGGATCCTC
<i>PAX8/PPARγ</i>	Forward (<i>PAX8</i> exon 7): AACCTCTCGACTCACCAGACCTA Forward (<i>PAX8</i> exon 9): CGGACAGGGCAGCTATGC Reverse: GTTGGTGGGCCAGAATGG

表16. The prevalence rate of genetic alterations in thyroid tumors

Genetic alterations	Genetic alteration cases / total cases (%)			
	Papillary carcinoma*1	Follicular carcinoma*2	Follicular adenoma*2	Adenomatous goiter
<i>BRAF</i>	12/15 (80.0)	0/15 (0.0)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>RAS</i>	0/15 (0.0)	9/15 (60.0)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>NRAS</i>	0/15 (0.0)	5/15 (33.3)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>KRAS</i>	0/15 (0.0)	2/15 (13.3)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>HRAS</i>	0/15 (0.0)	2/15 (13.3)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>RET/PTC</i>	1/15 (6.7)	0/15 (0.0)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>PAX8/PPARγ</i>	0/15 (0.0)	1/15 (6.7)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)
Total	13/15 (86.7)	10/15 (66.7)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)

*1: conventional type only *2: excluding oxyphilic cell type

表17. 細胞診検体を用いた遺伝子検査結果

症例	年齢	性別	細胞診判定	遺伝子異常		
				<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>	<i>RET/PTC</i>
1	70歳代	女性	意義不明	(+) V600E	(-)	(-)
2	20歳代	女性	悪性の疑い	(-)	(-)	(+) <i>RET/PTC1</i>
3	50歳代	女性	悪性の疑い	(+) V600E	(-)	(-)
4	50歳代	女性	悪性の疑い	(+) V600E	(-)	(-)
5	50歳代	女性	悪性の疑い	(+) V600E	(-)	(-)

表18. 濾胞癌の遺伝子検査結果（WHO第4版による分類）

遺伝子異常	Genetic alteration cases / total cases (%)		
	widely invasive	濾胞癌 encapsulated angioinvasive	minimally invasive (capsular invasion only)
<i>BRAF</i>	0/7 (0.0)	0/3 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>RAS</i>	7/7 (100.0)	2/3 (66.7)	0/5 (0.0)
<i>NRAS</i>	4/7 (57.1)	1/3 (33.3)	0/5 (0.0)
<i>KRAS</i>	2/7 (28.6)	0/3 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>HRAS</i>	1/7 (14.3)	1/3 (33.3)	0/5 (0.0)
<i>RET/PTC</i>	0/7 (0.0)	0/3 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>PAX8/PPARα</i>	0/7 (0.0)	1/3 (33.3)	0/5 (0.0)
Total	7/7 (100.0)	3/3 (100.0)	0/5 (0.0)