

「BD SurePath™法による気管支擦過細胞診における抗酸菌検出の有用性」 ～ 3 症例からの考察～

奈良県立医科大学付属病院 病院病理部 田中 京子、西川 武、龍見 重信
鈴木 久恵、竹内 真央、大林 千穂
奈良県立医科大学 病理診断学講座 大林 千穂

要旨

今回我々は、気管支擦過材料を用いた、BD SurePath™法によるliquid based cytology標本によりZiehl-Neelsen染色を行い、3症例の陽性所見を得た。通常、Ziehl-Neelsen染色は対物100倍の油浸で標本観察するが、蛍光法では対物20倍から40倍で行う為、感度がよい。しかしLBC標本によるZiehl-Neelsen染色では、対物20倍での観察により菌体のスクリーニングが可能であった。これは、Thinlayer法による作成標本の為、直接塗抹標本に比し、より観察評価に適する為、低倍での観察が可能であったと考えられた。低倍での観察は、検出感度の向上が期待できる。従ってZiehl-Neelsen染色による抗酸菌の検出に、LBC標本は有用であった。

I はじめに

今回、気管支鏡検査において、微生物検査と同時に細胞診および組織診が施行され、微生物検査では、抗酸菌染色判定が陰性であったが、BD SurePath™法によるliquid based cytology（以下LBC）標本でZiehl-Neelsen染色陽性所見が得られ、抗酸菌感染症の推定報告が可能であった3症例を経験したので報告する。

II 標本作製方法

経気管支肺擦過により採取された細胞診材料は、ブラシを弾いてスライドガラスへ塗抹するFlicked method法¹⁾により直接塗抹標本を作製した。またブラシ残余検体は、サイトリッチRED（日本ベクトンデッキンソン）保存液内に、カテ

ーター先端を浸し、カテーター内外にブラシの出し入れを行うことで、残余検体の回収を行った（図1）。回収したサイトリッチRED保存液の半量でLBC標本を作製し、半量は、遺伝子検査、免疫染色、その他の染色用に保存した。なお、検体採取による感染予防対策として、N95マスク、ガウン、帽子、ゴーグルを前処置の時点から装着²⁾し作製した。また、経気管支により採取された組織は、ただちに10%中性緩衝ホルマリンで固定し、24時間以内に切り出しを行った。

III 抗酸菌染色方法

最新染色法のすべて³⁾の手順に従い染色を行った。また、弱抗酸菌群の検出には広井らの方法で染色を行った。

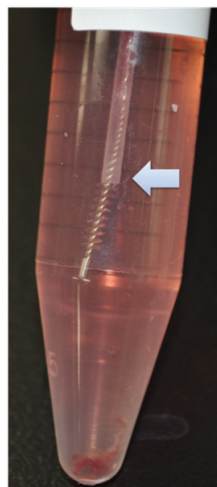


図1 ブラシ残余検体回収法
サイトリッチRED保存液内に、カテーター先端を浸し、カテーター内外（矢印）でブラシの出し入れを行うことにより、カテーター先端部でブラシが弾かれる。これによりブラシ内に付着した残余検体が回収される。

IV 症例

症例1 50歳代男性

主訴：血痰・慢性咳嗽・倦怠感・体動による両側胸部疼痛

現病歴：一年前、血痰・慢性咳嗽を自覚することで受診、CTで右上肺野に空洞を伴う異常陰影が認められた。8ヵ月後に同様の症状が現われたが、去痰薬にて症状は改善した。またCT画像上も陰影は退縮していた。しかし、その後も咳嗽が消失せず、血痰が出現するため紹介受診された。施行されたCTで、径7cmの空洞を有する塊状影がみられ、PET検査において、不均等な集積と肺門部リンパ節にも弱い集積を認めたため、腫瘍を念頭においた精査目的で、気管支鏡検査により生検、擦過細胞診及び微生物検査が施行された。

細胞所見：直接塗抹染色では、好中球主体の炎症細胞が見られるのみであったが、LBC標本では、炎症細胞を背景に、ライトグリーンに染色される分枝状集塊が見られた。LBC標本の強拡大像では、クモの巣状に分岐する細い菌糸の集塊が見られた。直接塗抹標本によりグラム染色を行ったところ、好中球が集塊している部分に、分岐したフィラメント状のグラム陽性桿菌を認め、LBC標本によるZiehl-Neelsen染色により、菌体は弱陽性に染色され（図2）、ノカルジア症と診断された。

組織所見：高度のリンパ球・形質細胞主体の浸潤で、肺胞腔内には上皮様細胞が増生するが、異型性に乏しく、化生上皮と思われた。PAS, Grocott, Ziehl-Neelsenの特殊染色で、ノカルジアは検出されなかった。

微生物検査：グラム染色で分岐したフィラメント状のグラム陽性桿菌が見られたが、抗酸菌染色蛍光法（-）であった。

症例2 60歳代男性

主訴：咳嗽・倦怠感

現病歴：膵癌術後、肝転移にて当院消化器外科受診、右上葉に空洞を伴う結節影をみとめたため精査目的で、気管支鏡検査及び擦過細胞診、微生物検査が施行された。

細胞所見：直接塗抹法、LBC法共に変性所見を

有する腺上皮細胞が少数みられた。類上皮細胞やラングハンス巨細胞などは見られなかったが、背景には壊死物質が見られ、LBC標本でZiehl-Neelsen染色を行った。対物20倍でのスクリーニングにより赤色染色物質が見られ、対物100倍での観察により、抗酸菌の確認を行った（図3）。

微生物検査：抗酸菌染色蛍光法（-）であった。

症例3 70歳代女性

主訴：発熱・咳嗽

現病歴：年に1回健康診断を受けていたが、5年前の検診にて胸部異常陰影を指摘されていた。徐々に咳嗽の頻度が増し、一昨年、気管支鏡検査で、肺非結核性抗酸菌症と診断され内服加療が開始されたが、以後も異常陰影は残存していた。気管支鏡直前の胸部CTでは左肺野背側の空洞影の拡大を認め、腫瘍性病変も否定できず、気管支鏡検査及び生検、擦過細胞診、微生物検査が施行された。

細胞所見：直接塗抹法、LBC法共に炎症細胞や壊死物質を背景に、ラングハンス巨細胞が散見され、LBC標本でZiehl-Neelsen染色を行った。対物20倍でのスクリーニングにより赤色染色物質が見られ、対物100倍で抗酸菌の確認を行った（図4）。

組織所見：高度のリンパ球浸潤を伴う組織で、一部では類上皮細胞肉芽腫様の構造が窺われた。PAS, Grocott, Ziehl-Neelsen等の特殊染色を行ったが、明らかな病原体の存在は確認できなかった。

微生物検査：抗酸菌染色蛍光法（-）であったが、PCR法により、mycobacterium intracellulareが検出された。

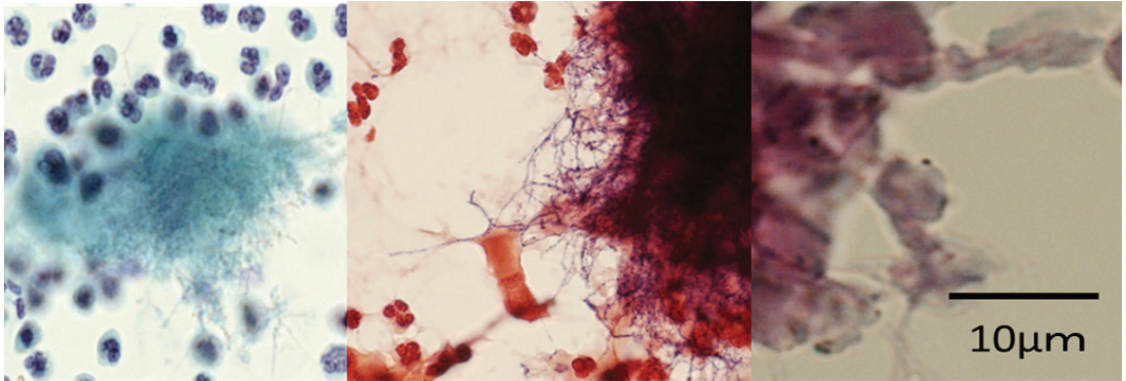


図2 症例1 左：LBCパパニコロウ標本対物 100倍 中央：直接塗抹標本グラム染色 対物100倍
右：LBC標本Ziehl-Neelsen染色 拡大像

ライトグリーンに染色される分枝状集塊であり、グラム染色では、グラム陽性のクモの巣状に分岐する細い菌糸の集塊が見られる。ノカルジアが疑われ、Ziehl-Neelsen染色を行ったところ、菌体は弱陽性に染色された。

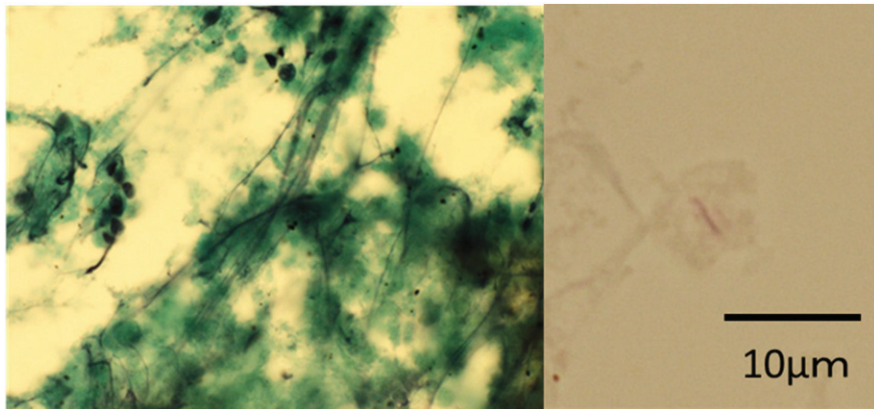


図3 左：パパニコロウ標本 対物20倍 右：Ziehl-Neelsen染色 拡大像
背景は壊死性で変性所見を有する腺上皮細胞が少数みられた。
Ziehl-Neelsen染色を行ったところ抗酸菌が確認された。

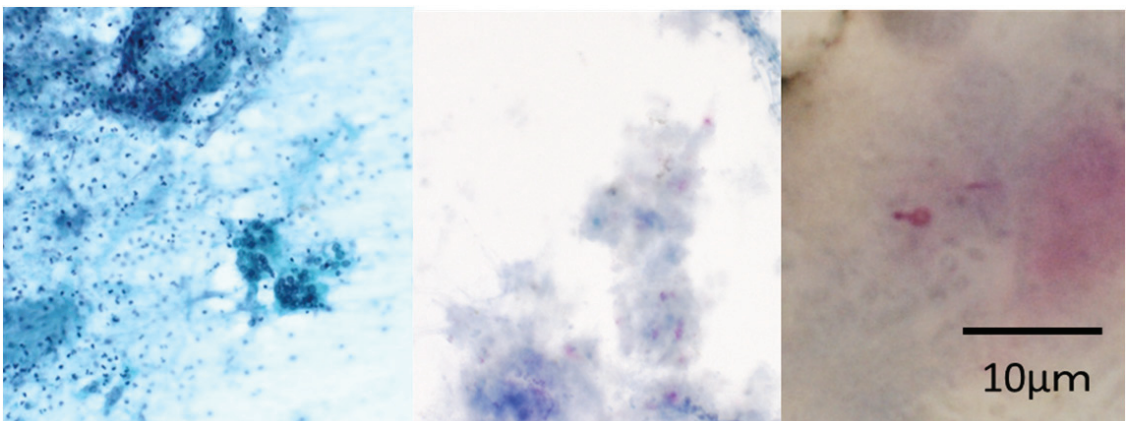


図4 左：パパニコロウ標本 対物10倍 中央：Ziehl-Neelsen染色 対物20倍
右：Ziehl-Neelsen染色拡大像

炎症細胞や壊死物質を背景に、ラングハンス巨細胞が散見された。
Ziehl-Neelsen染色を行い抗酸菌が認められた。なお、アスペルギルス等真菌を疑う菌糸は認められなかった。

V 考察

近年、Thinlayer法は非婦人科領域への応用が盛んに研究され、細胞診診断への寄与が高いこと⁴⁻⁶⁾が明らかとなっており、特殊染色では、喀痰や気管支洗浄液に対するグロコット染色への応用⁷⁾も試みられている。我々の施設においても、気管支擦過の標本作製には直接塗抹法と共に、BD SurePath™法によるLBC標本の作製を行っている。今回細胞診LBC標本において、Ziehl-Neelsen染色による抗酸菌の検出が可能であった3症例を経験した。

抗酸菌染色は通常、直接塗末標本により染色を行っている。この直接塗抹標本は、簡便に標本の作製が行える反面、採取細胞の損失や、採取試料の細胞構成を正しく反映していない等のサンプリングエラー⁸⁾⁹⁾や、標本塗抹時に血液や粘液等により評価細胞が被蓋されること¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾等の問題が指摘されており、偽陰性報告の多くは、直接塗末標本が原因であるとされている。

抗酸菌染色は、蛍光法とZiehl-Neelsen染色に大別され、蛍光染色はZiehl-Neelsen染色に比し、検出感度が高いとされている。これは、検出系の問題ではなく、Ziehl-Neelsen染色は1,000倍で観察するのに対して、蛍光染色は200または400倍で観察を行うため、1視野あたりの面積が大きく観察されることによる、観察倍率による差異¹³⁾であるとされている。しかし、蛍光染色では、蛍光性をもつ汚染物を抗酸菌に誤認する可能性があるため、必ずZiehl-Neelsen染色での抗酸菌の確認が必要となる。したがって、Ziehl-Neelsen染色による低倍での観察が可能となれば、蛍光法と同等の検出感度が得られ、再染色の必要もない。

今回我々は、微生物学的検査において抗酸菌陰性と判断され、細胞診LBC標本において抗酸菌の検出が可能であった3症例を経験した。すべての標本において、微生物学的検索は直接塗末標本であり、細胞学的検索はLBC標本である。そして、特筆すべきは、LBC標本によるZiehl-Neelsen染色では、対物20倍でのスクリーニングで十分確認が可能であったことである。LBC標本は、採取細

胞は100%回収され、回収細胞溶液より、細胞がスライドガラス上に薄く均等に塗抹されることからthin layer法あるいはmonolayer法とも呼ばれている。この為、細胞の損失や評価細胞への炎症細胞等の被覆は見られず、採取細胞が反映する為、標的細胞を見出しやすい。この為対物20倍でのスクリーニングにおいても、抗酸菌の確認が容易となった可能性が高い。また、対物20倍でのスクリーニングが可能であることより、LBC標本作製手技によるZiehl-Neelsen染色においては、蛍光法を行った場合と同等の抗酸菌検出感度が得られる可能性がある。

細胞診に提出される検体は、常に微生物学的検査に提出される検体と同一ではない。従って、微生物学的検査により抗酸菌染色が陰性であっても、細胞診標本で陰性とは限らない。抗酸菌染色における陽性報告は、常に重い意味をもつ。抗酸菌染色のみでは確定診断はつかないが、抗酸菌感染症の疑いという報告は、患者の治療選択肢の幅を広げ、日常の臨床診療に大きく寄与することが可能であった。これより、LBC手技を用いた標本作製法は、呼吸器領域における感染症診断に寄与する可能性が高い。

参考文献

1. Winifred Gray, Gabrijeka Kocjan. Diagnostic cytopathology third edition, chapter 26, Cytology of the body of the uterus. London: Elsevier, 2010: 689-720.
2. 日本呼吸器内視鏡学会. 手引き書—呼吸器内視鏡診療を安全に行うために— (Ver. 3.0), 日本呼吸器内視鏡学会安全対策委員会. 2013年4月: http://www.jsre.org/medical/1304_tebiki.pdf
3. 藤田浩司, 広井禎之, 黒田雅彦. 最新染色法のすべて, 抗酸菌染色. 東京: 医歯薬出版株式会社, 2011: 93-8.
4. 有安早苗, 平本直美, 佐藤正和, 他: 尿細胞診におけるThinlayer法の有用性, フィルター法との比較. 日臨細胞学会岡山会誌. 2007;

- 26:32-4.
5. 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 (6): 495-501.
 6. 平紀代美, 松林 聡, 東 学, 他: Liquid based cytology (Thin-layer標本) による乳腺穿刺針洗浄細胞診の評価. 日臨細胞会誌. 2006;45 (2):77-83.
 7. 梅森宮加, 梅澤 敬, 高橋 潤, 他: BD シュアパスTM 液状標本を用いたグロコット染色の検討—喀痰・気管支洗浄液—. 医学検査. 2014;63(6):758-61.
 8. 手塚文明, 秀城浩司, 及川洋恵, 他: 子宮頸部から擦過採取される細胞数とスライド標本に塗抹される細胞数. 日臨細胞会誌. 1994;33 (3):463-7.
 9. Goodman A1, Hutchinson ML. Cell surplus on sampling devices after routine cervical cytologic smears. A study of residual cell populations. J Reprod Med. 1996; 41 (4): 239-41.
 10. Macgoogan E, Rrith A. Would monolayer provide more representative samples and improved preparations for cervical screening? Acta Cytol. 1996;40(1):107-19.
 11. van der Graaf Y, Vooijs GP, Gaillard HL, et al. Screening errors in cervical cytologic screening. Acta Cytol. 1987;31 (4):434-8.
 12. Linder J, Zahniser D. ThinPrep Papanicolaou testing to reduce false-negative cervical cytology. Arch Pathol Lab Med. 1998 122(2):139-44.
 13. 青野昭男, 近松網代, 山田博之, 他: 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み. 日臨微生物学誌. 2012;22(4):279-83.