

「喀痰LBC標本の有用性～感染症診断の観点から～」

奈良県立医科大学附属病院 病院病理部 龍見 重信(CT)、西川 武(CT)
鈴木 久恵(CT)、竹内 真央(CT)
田中 京子(CT)、大林 千穂(MD)

要 旨

Liquid based cytology (以下、LBC) 法は、婦人科をはじめ、様々な領域でスクリーニングに広く使用されているが、免疫染色や特殊染色への応用にも有用であり、診断成績の向上に寄与することが示されている。しかしながら、喀痰細胞診では、粘液成分の存在からLBC標本の作製が困難とされており、標本作製技術が確立していない。今回我々は、喀痰の粘液融解作用を有する(±)-ジチオトレイトールdithiothreitol (以下、DTT) を用い、BD SurePath™法において作製した喀痰LBC標本から感染症診断に寄与できた4症例を経験した。いずれの喀痰LBC標本においても、細胞学的形態の特徴は直接塗抹標本と同様であった。これより、喀痰検体でのLBC法による標本作製は感染症の推定に寄与する可能性が示唆された。

Keywords : 感染症、喀痰、LBC標本、直接塗抹標本、粘液融解剤

I 目 的

肺癌のスクリーニングには、喀痰細胞診が用いられる。しかし、癌のスクリーニング以外にも、ニューモシスチス肺炎 *Pneumocystis Pneumonia* (以下、PCP) や肺クリプトコッカス症、結核等の感染症の推定は治療の点から非常に重要になる。喀痰細胞診は非侵襲的で簡便であるが、標本作製に習熟を要し、かつ粘液等の上皮細胞以外の成分も多数出現するため、スクリーニングの困難さやその後の特殊染色等の応用にも問題点が残る。近年、liquid based cytology (以下、LBC) 法は婦

人科領域をはじめ、様々な領域においてスクリーニング、特殊染色等への応用が可能であると報告されている¹⁻³。しかしながら、喀痰等の粘液成分の豊富な検体においては、LBC標本の作製が困難とされており、標本作製に関する文献は少なく、検討が必要である⁴⁻⁶。我々はBD SurePath™法による喀痰LBC標本 (以下、LBC標本) 作製方法として、(±)-ジチオトレイトールdithiothreitol (以下、DTT) を用いた検討を行ってきた。今回、感染症の推定にLBC標本が有用であった4症例を経験したので報告する。

II 材料および方法

2017年1月から12月に提出された喀痰検体173例のうち、パパニコロウ標本上、感染症の所見が得られた4例。喀痰標本作製法はスプリットサンプル法を適用し、すり合わせ法により直接塗抹標本を作製後、LBC標本を作製した。LBC標本作製法は、Cytorich Red (以下、CR) (Becton, Dickinson and Company) に粘液融解剤として0.5% DTT (Wako) を混和した保存液を喀痰残検体に添加、よく攪拌した後、一晚固定した (表1)。その後、BD SurePath™標本作製手順/非婦人科材料用手法に則った。

表1. 喀痰LBC標本作製法

- | |
|--|
| 1) 0.5%DTT*添加Cytorich Redを喀痰に添加
2) よく攪拌
3) 室温で一晩固定
以下、BD SurePath™法に則って、手動的に標本を作製 |
|--|

* (±)-ジチオトレイトール (dithiothreitol)

Ⅲ 症例

症例1 80歳代男性。

主訴：空洞を伴う多発性肺結節影、粒状影精査加療目的。

生活習慣：機会飲酒、喫煙60本/日。

現病歴：当院糖尿病定期受診時、血液検査で白血球数およびCRPの上昇と、胸部単純X線で右上肺野および左下肺野に結節影を認め、肺炎と診断された。その後、胸部CTで右上葉に境界明瞭な多発性空洞結節を指摘され、真菌症や抗酸菌症が疑われた。T-SPOT、喀痰塗抹、培養およびPCR陰性であり、抗酸菌症は否定的であった。一方、アスペルギルス抗原陽性であり、肺真菌症も疑われたが、以降アスペルギルス抗原は低下傾向であり、症状もなかった。血液検査でも著変を認めなかった。

細胞所見：直接塗抹標本/パパニコロウ染色では、炎症細胞や粘液を背景に多核圧排細胞が点在していた。LBC標本/パパニコロウ染色では、鮮明化された背景に直接塗抹標本と同様の多核圧排細胞を多数認めた(図1)。多核圧排細胞は、すりガラス状で核縁へのクロマチンの凝集がみられ、その染色性は直接塗抹標本およびLBC標本と同様の染色性を示していた。これらより、ヘルペスウイルス感染細胞が推定された。

症例2 40歳代男性。

主訴：呼吸困難、発熱。

生活習慣：機会飲酒、喫煙20本/日。

現病歴：39℃台の発熱を認め、近医を受診した。胸部単純X線にて両側肺野のスリガラス陰影と網状影を認め、同時に腰痛なども認めたことから、骨髄炎や腎盂腎炎からの菌血症および急性呼吸窮迫症候群 acute respiratory distress syndrome (以下、ARDS) 疑いとして紹介受診された。当院での胸部単純X線でも両側肺野のスリガラス陰影を認め、血液検査にてCRPおよび β -Dグルカンの上昇がみられたため、ニューモシスチス肺炎が疑われた。

細胞所見：直接塗抹標本およびLBC標本/パパ

ニコロウ染色では、比較的鮮明な背景にライトグリーン淡染性の泡沫状物質が認められた。直接塗抹標本/メイギムザ染色では、泡沫状物質の内部は類円形に陰性染色を示した。直接塗抹標本およびLBC標本/グロコット染色では、泡沫状物質に一致し、集簇性にグロコット染色陽性の円形から三日月状の嚢子型菌体が確認され、その染色性は直接塗抹標本およびLBC標本と同様の染色性を示していた。これらより、ニューモシスチス・イロベチ原虫が証明された(図2)。

症例3 50歳代女性。

主訴：意識障害、発熱。

生活習慣：飲酒なし、喫煙なし。

現病歴：発熱と意識障害のため、近医を受診した。胸部CTで両側肺に浸潤影を認め、髄液検査にて、墨汁染色で酵母様真菌を認め、クリプトコッカス髄膜炎と診断された。精査加療目的のため、当院に救急搬送された。血液検査では血糖値およびCRPが高値であった。髄液検査では、外観は淡黄色、多核球や単核球が高値、蛋白高値、および髄液糖値が低値であり、墨汁染色でクリプトコッカスが同定された。

細胞所見：直接塗抹標本/パパニコロウ染色では、菌体はみられなかった。一方、LBC標本/パパニコロウ染色では円形や涙滴状の菌体が多数確認でき、均等の間隙をもつ二重の厚い隔壁をもつ二重膜構造を示していた。LBC標本/グロコット染色においても、二重膜構造をもつ菌体が確認された(図3)。これらより、クリプトコッカスが推定された。

症例4 80歳代男性。

主訴：COPD、石綿肺、重症肺炎、ARDS、間質性肺炎の急性増悪、高血圧症、十二指腸術後。

生活習慣：飲酒3合/日、喫煙50本/日。

現病歴：嘔気、嘔吐および心窩部不快感を認め、近医を受診した。血液検査で肝機能異常、胆道系酵素(AST、ALT、ALP、 γ GTP)の上昇と黄疸を認め、腹部造影CTで肝内胆管・総胆管の拡

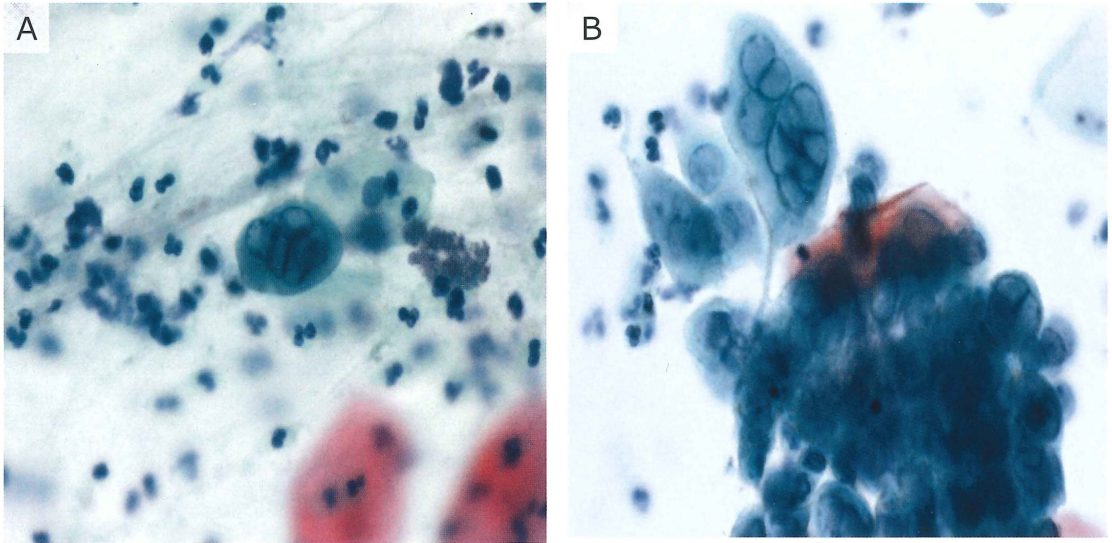


図1. 症例1における直接塗抹標本とLBC標本の細胞像の比較
 A) 直接塗抹標本パパニコロウ染色×600、B) LBC標本パパニコロウ染色×600

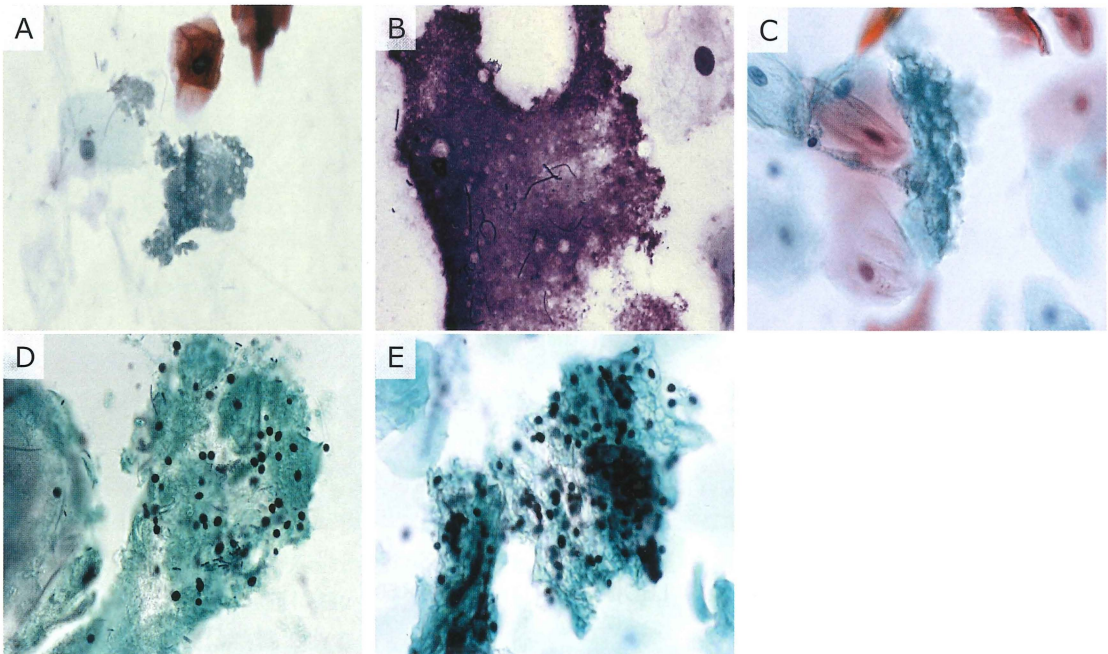


図2. 症例2における直接塗抹標本とLBC標本の細胞像の比較
 A) 直接塗抹標本パパニコロウ染色×600、B) 直接塗抹標本メイギムザ染色×600
 C) LBC標本パパニコロウ染色×600、D) 直接塗抹標本グロコット染色×600
 E) LBC標本グロコット染色×600

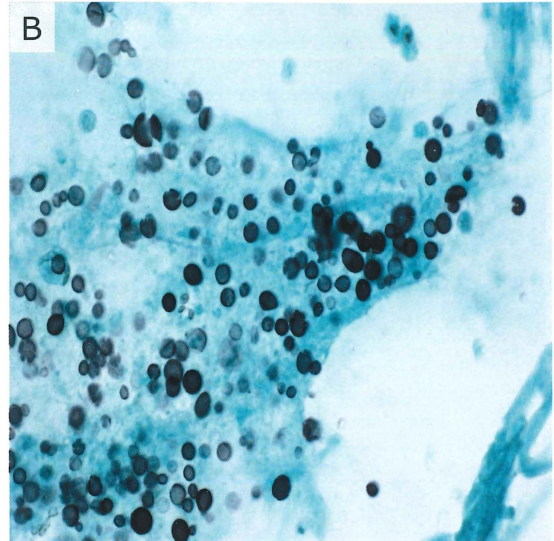
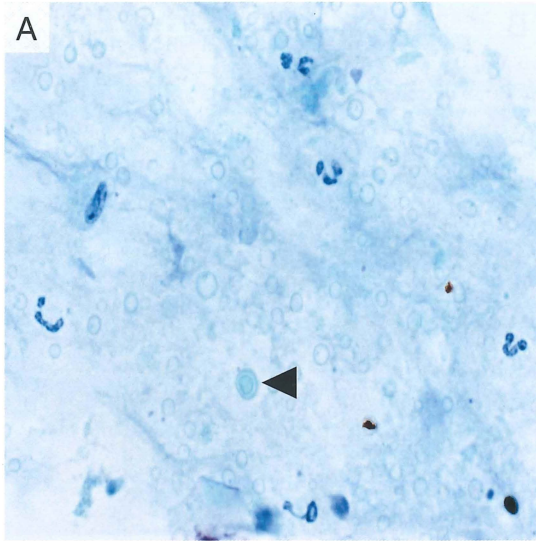


図3. 症例3におけるLBC標本の細胞像
A) LBC/パニコロウ染色×600、B) LBC標本グロコット染色×600
LBC標本による莢膜の二重膜構造 (矢頭)。

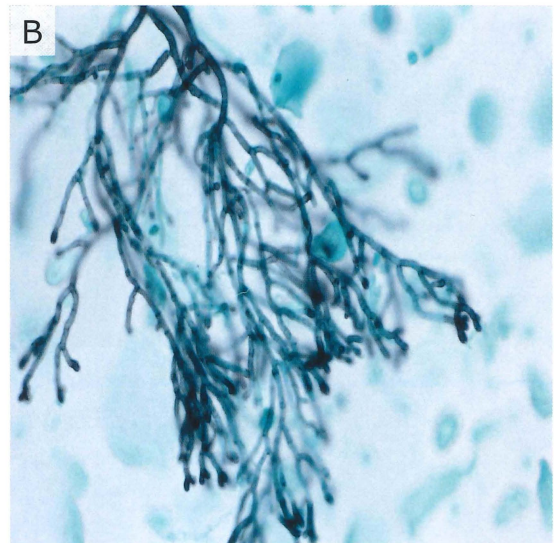
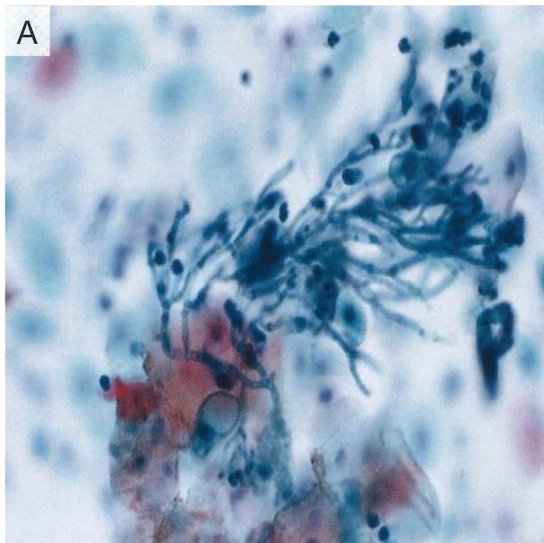


図4. 症例4におけるLBC標本の細胞像
A) LBC/パニコロウ染色×600、B) LBC標本グロコット染色×600

張が認められ、精査加療目的のため紹介受診された。当院の血液検査ではCRPおよび β -Dグルカンの上昇がみられ、PCPが疑われた。

細胞所見：直接塗抹標本/パニコロウ染色では、菌体はみられなかった。一方、LBC標本/パ

パニコロウ染色では、菌体が確認でき、45度分枝構造を示す菌糸がみられた。LBC標本/グロコット染色では、くびれのない45度分枝構造を呈し、菌糸の幅が一定で、菌糸形態に不整がなく、多くの隔壁を有し、一定の増殖方向性を有する菌糸が

確認され、アスペルギルスが推定された(図4)。

IV 直接塗抹標本とLBC標本の出現細胞率の比較

1. 方法

症例1、2において、パパニコロウ標本上で該当感染症が推定された細胞ないし菌塊数を数え、標本単位面積あたりの出現率を比較した。

2. 結果

症例1では、多核圧排細胞は直接塗抹標本で0.5個/cm²、LBC標本で13個/cm²であった。症例2では、ニューモシチス・イロベチ原虫は直接塗抹標本で0.9個/cm²、LBC標本で8個/cm²であった。

V 考察

日本人の死亡原因の第一位は癌であり、部位別にみた癌の死亡率において、肺癌は男性の第一位、女性の第二位となっており、喀痰細胞診による肺癌のスクリーニングは依然として有用である。しかしながら、死亡原因の第三位は肺炎であり、呼吸器領域では感染症も生命にかかわる重要な疾患である。そのため、細胞診では、悪性診断のみならず、感染症にも十分な注意を払わなければならない。感染性肺疾患には、ウイルス性肺炎やニューモシチス肺炎、真菌性肺炎が含まれ、日本で経験される主な深在性真菌感染症においては、カンジダ症、アスペルギルス症の頻度が高く、次いで、クリプトコッカス症、ムコール症などがある⁷。そのうち特にアスペルギルス症とクリプトコッカス症は二大肺真菌症といわれている⁸。したがって、喀痰細胞診でこれらの感染症を診断できることは臨床的にも非常に意義がある。

近年広く使用されているLBC標本は、集細胞の効率性や背景の鮮明化、特殊染色への応用の容易さの観点から、感染症診断においても有用性が高い⁹。しかし、喀痰は粘稠であることからLBC標本作製が困難であるとされている。そこで当院では、喀痰の粘液融解作用を有するDTTを用いた喀痰LBC標本の作製の検討を行ってきた。その結果、感染症に対する有効性として今回紹介したヘルペスウイルス感染が示唆されるすりガラス様多

核細胞の検出、ニューモシチス・イロベチ感染が示唆される泡沫状物質ならびにグロコット染色による菌体の同定、クリプトコッカス感染やアスペルギルス感染を疑う菌体の検出およびグロコット染色による菌体の推定がLBC標本においても可能であることが示唆された。また、単位面積あたりの出現率はLBC標本が直接塗抹標本より優れ、LBC標本は感染細胞あるいは菌体スクリーニングにも有用である可能性が示唆された。

粘液融解剤を用いた喀痰LBC標本によるスクリーニングは直接塗抹標本と大差ない形態学的特徴を把握でき、また、特殊染色を追加できることから感染症診断に寄与する可能性が高い。今後、症例数を増やしたさらなる検討が必要とされる。

VI 参考文献

1. 志賀朋子, 志賀清彦, 菊池式子, 他: 子宮頸がん検診における従来法と液状法の比較検討について. 人間ドック. 32(3): 525-529. 2017.
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—. 日本臨床細胞学会雑誌. 52(6): 495-501. 2013.
3. Jiwoon Choi, Se Hoon Kim. Liquid-Based Cytology of the Cerebrospinal Fluid in a Case of Cryptococcal Meningitis. J Pathol Transl Med. 52(1): 61-63. 2018.
4. 黒島義克, 大竹賢太郎, 遠藤理子, 他: 液状化検体細胞診 (Liquid-Based Cytology ; LBC) 作製過程における粘液の影響. 日本臨床細胞学会雑誌. 51(3): 220-221. 2012.
5. 土屋幸子, 梅澤敬, 堀口絢奈, 他: スプタザイムを用いた粘液性検体へのBDシユアパス™液状化細胞診の導入. 医学検査. 65(4): 414-418. 2016.
6. Saraswathy Veena V, Sara George P, Jayasree K, et al. Comparative analysis of cell morphology in sputum samples homogenized with dithiothreitol, N-acetyl-L cysteine,

- Cytorich(®) red preservative and in cellblock preparations to enhance the sensitivity of sputum cytology for the diagnosis of lung cancer. *Diagn Cytopathol.* 43 (7): 551-558. 2015.
7. 肺炎：診断と治療の進歩 IV. 肺真菌症. 日本内科学会雑誌. 94(11). 2005. 49-54.
 8. 深在性真菌症のガイドライン作成委員会. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン. 東京. 協和企画. 2014: 60-62.
 9. 田中京子, 西川武, 龍見重信, 他: BD Sure Path™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～. 奈良県臨床細胞学会雑誌. 17: 7-11. 2017.