原 著

Saccomanno 法による喀痰細胞診成績

大阪府立成人病センター

成瀬 靖悦 松田 実

I. はじめに

喀痰細胞診の陽性率を向上させる試みとして, 1960 年頃に集細胞法の研究がすすめられた^{3,4,7,9)}. しかしこれらの方法は, 操作が複雑なわりには陽性率を高め得ないことから普及しなかった.

著者の 1 人, 松田は日米癌研究協力事業の細胞診部門の一員として渡米する機会を得, Mayo Clinic を中心とした Lung Project では, 喀痰細胞診に Saccomanno の方法が用いられ^{1,2)}, occult lung cancer の発見に極めて役立っていることを知った.

Saccomanno の方法は 1963 年に報告されており⁹⁾, 細胞診断陽性率に関しては, 26 例の原発性および転移性肺癌のうち, oat cell ca を 1 例見落とし, 他に 2 例の false negative を出したと述べているにすぎない.

われわれは, 1976 年夏, 国立がんセンター池田茂人博士のご好意により, Saccomanno の開発せる装置を入手できたので, その方法を紹介するとともに, 本法を用いて行った細胞診成績, 本法で得られた癌細胞の形態学的特徴, およびスクリーニングを行う上で注意すべきことなどについて報告する.

II. Saccomanno 液による癌細胞の変性について

Saccomanno が喀痰の保存に用いている液は, 下記のとおりである.

95%エタノール	6,316 ml
濾過した水	5,445 ml
カーボワックス 1540	240 ml

Sputum cytology using saccomanno's method
Yasuyoshi Naruse C.T.I.A.C. (CMIA) and Minoru
Matsuda, M.D., M.I.A.C.
The Center for Adult Diseases, Osaka
昭和 52 年 3 月 28 日受付

カーボワックス 1540 は, 43~46°C に溶かして加える. すなわち 50%アルコールに 2%の割にカーボワックスを加えたことになる.

1. 観察材料および方法

気管支鏡, TV ブラシ法による病巣擦過物あるいは肺穿刺材料を使用し, 直接塗抹標本を作成後, 残りの材料を Saccomanno 液に浸し, 1 週間, 2 週間, 4 週間保存した後, 材料をオートスメアにかけて, 標本を 1 枚ずつ作り, パパニコロウ染色を行った. このようにして作成した標本について, 細胞配列, 細胞質, 核, 核小体の形態を観察し, 細胞変性の程度を検討した. 観察を行った材料は扁平上皮癌 2 例, 腺癌 8 例, 小細胞型未分化癌 3 例であった.

2. 成績

1) 扁平上皮癌細胞

直接塗抹標本とほぼ同様の細胞所見であるが, クロマチンが粗大凝集を示すもの, および核小体の明瞭なものが増加する.

2) 腺癌細胞

直接塗抹標本に比べ細胞質辺縁が明瞭なもの, 細胞質が濃染するもの, 時に裸核状のもの, 核縁の不整肥厚を示すもの, クロマチンが粗顆粒状を示すものが多くなってくる (図 1, 2).

3) 小細胞型未分化癌細胞

直接塗抹標本に比べて癌細胞が立体的小集団を作る傾向が多く, 核縁が不整肥厚したものや, クロマチンが粗顆粒状, 濃縮, 融解状を示すものが増加する. また核小体の明瞭にみられるものが増加する (図 3, 4).

すなわち, 直接病巣より採取した材料を, Saccomanno 液に保存した場合, 1 週間後には細胞の変性がある程度認められるが, その程度は, 腺癌および小細胞型未分化癌で著明であった. このような細胞変化は, 保存 4 週間後, 1 週間後の細胞所見とかわりなかった. 以上をまとめて表 1 に示す. 2 週間後の細胞所見は 1 週または 4 週間後の細胞所見とかわらないために省略した.

表 1 直接採取材料を Saccomanno 液に保存した場合の細胞所見

	保存期間	細 胞		細 胞 質		核		核 小 体	
		配 列	辺 縁	染色性	性 状	核 縁	クロマチン	大きさ	数
扁平上皮癌細胞	直接塗抹	散 在 性	明 瞭	多 彩	重 厚	粗 剛	粗顆粒状		認めがたい
	1 週 間	〃	〃	〃	〃	〃	粗顆粒状または粗大凝集	小	1~3個または認めず
	4 週 間	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
腺癌細胞	直接塗抹	立 体 的	不明瞭	青緑色	淡明泡沫状	薄 い	微細顆粒状	大	1個または認めず
	1 週 間	〃	不明瞭または明瞭	緑 色	淡明泡沫状濃染重厚時に裸核	薄いまたは不整肥厚	細顆粒状または粗顆粒状	〃	〃
	4 週 間	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
小細胞型未分化癌細胞	直接塗抹	散 在 性	不明瞭	不明瞭	不明瞭	薄 い	細顆粒状	小	1~3個または認めず
	1 週 間	散在性または立体的小集団	〃	〃	〃	薄いまたは不整肥厚	粗顆粒状濃縮融解状	〃	〃
	4 週 間	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃

III. Saccomanno の方法

Saccomanno 液に蓄痰した材料を次のように処理する。

- (1) Container に喀痰をいれ、ブレンダー（図5）で3~5秒攪拌する（21,000回転）。喀痰は完全なエマルジョンとなるが、不十分であればさらに5秒間追加する。
- (2) 50 ml の砲弾スピッツに注ぎ、1,000~1,500 回転で約10分間遠沈する。
- (3) 上清をすてる。
- (4) サーモミキサーにかけ（数秒間）沈渣を均等な液とする。
- (5) ピペットで、一滴吸引してスライドグラス上にのせ、すり合せ方式で塗抹する。通常2枚作成する。
- (6) 完全に乾燥させる。急ぐ時は 37℃ の伸展台にのせるとよい。

- (7) 95%エタノールで10分間再固定。
 - (8) パパニコロウ染色を行う。
- Saccomanno が行っている染色法は下記のとおりである。

- (1) 95%エタノールで10分間再固定。
- (2) 流水で5分間洗浄。
- (3) 50% Lillie-Mayer Hematoxylin で1分間染色。
- (4) 標本面がきれいになるまで流水で洗浄。
- (5) 95%エタノールを2回通す。

- (6) OG-6 3分。
- (7) 95%エタノールを3回通す。
- (8) EA65 2分。
- (9) 95%エタノールを3回通す。
- (10) 純エタノールを2回通す。
- (11) キシロールで透徹。封入。

標本作成に要する時間は約20分、染色に要する時間は30分である。

ブレンダーは喀痰を入れる container と下の本体に取りはずすことができ、contamination を防ぐために、1検体、1 container を使用することが望ましい。使用した container は、一昼夜クレゾール水に浸し、その後水洗し、乾燥させて使用する。

IV. Saccomanno 法による細胞診成績

1. 検査対象および方法

216例の外来または入院患者の喀痰を用いて通常の方法で直接塗抹標本を2枚作り、残りの喀痰を Saccomanno 液にうつし保存した。

同一症例の喀痰は2~3回分を一つの容器にまとめて保存し、Saccomanno の方法で2枚の標本をすり合せ方式で作成した。われわれは Lillie-Mayer Hematoxylin のかわりに Harris Hematoxylin を用いた。

判定は直接塗抹法では陽性、疑陽性、陰性とし、3回のうち1回でも陽性があれば陽性と判定した。Saccoma-

表 2 Saccomanno 法による喀痰細胞診成績

検査方法	検査例数	肺癌例数	陽性例数	陽性率
直接塗抹法	216	39	18	46.1%
Saccomanno 法	216	39	25	64.1%

nno 法を行った症例も同様に陽性、疑陽性、陰性と判定し、両方の陽性率を比較した。

2. 成 績

検査対象 216 例中、癌例は 39 例であった。39 例中、直接塗抹標本にて陽性と診断したものは 18 例 (46.1%) 疑陽性は 3 例であった。

本法における陽性例は 25 例 (64.1%) で、直接塗抹標本に比べて陽性率が 18% 上昇した。なお本法で非癌例を疑陽性としたものが 3 例あった (表 2)。

V. Saccomanno 法による細胞所見

肺癌 39 例中、本法で陽性とした扁平上皮癌 5 例、腺癌 14 例、小細胞型未分化癌 6 例について、癌細胞の細胞質、核、クロマチン、核小体の所見を観察した。

1. 観 察 成 績

1) 標本の肉眼的所見

直接塗抹法では塗抹面に濃淡がみられるが、本法では均等な厚みに塗抹されている (図 6)。

2) 弱拡大による観察

直接塗抹標本に多く出現する線維様物質 (図 7) は切断され、ばらばらになって出現する (図 8)。上皮細胞および白血球は標本面に均等に分布して観察される (図 11, 15)。

3) 正常細胞

扁平上皮細胞および線毛円柱上皮細胞は従来の塗抹標本にみられる所見と全くかわりはない (図 9)。組織球は、細胞質が泡沫状の特徴を有しつつ厚みを増すものが増加する (図 10)。

4) 扁平上皮癌細胞

扁平上皮癌細胞は散在性に出現し、細胞質は均一に濃染し、その辺縁は明瞭である。

直接塗抹標本に比べて、クロマチンが粗くなり、核小体が認めやすくなる (図 12, 13, 14, 19)。

5) 腺癌細胞

腺癌細胞は小集団を作って出現するが、重積性は少なくなる (図 17)。また単個細胞が多くみられるようになり、腺癌細胞特有の腺様配列をみることは少なくなる。細胞質は均一に濃染するものが増加するが、淡染性のもの、裸核様のもの、網の目状のものも混在して出現す

る。細胞質辺縁は明瞭なものと不明瞭なものが混在し、核縁は薄いものと不整肥厚したものが混在する。クロマチンは細顆粒状のものと、粗顆粒状のものがみられ、核小体は多くは 1 個明瞭に認められる。一般に直接塗抹法に比べて細胞集団の重積性が減少し、細胞質、核とも変性所見が強くなり、核小体は明瞭に見られることが多い (図 16, 18, 20, 21)。

6) 小細胞型未分化癌細胞

直接塗抹標本では小細胞型未分化癌細胞は散在性に出現するが、本法では粘液が細断されるため、柵状配列はみられず、むしろ小集団となって出現する (図 23, 24, 25, 26)。クロマチンは濃縮したもの、粗顆粒状のもの、融解状のものが混在して出現する。小さい核小体が比較的認めやすくなる (図 22, 24)。一般に直接塗抹法に比し、細胞は小集団を作る傾向が多くなり、核の変性所見が増加する。

2. スクリーニングの注意事項

1) 一次スクリーニングに際しては、細胞が均等に分散して、異型細胞の発見が容易であるが、白血球の非常に多い標本ではむしろスクリーニングに時間がかかる場合がある。

2) 癌細胞は正常細胞より濃染傾向が強いため、核、細胞質ともに濃染したものを見逃さないこと。

3) 腺癌細胞、小細胞型未分化癌細胞は集団を形成することが多いので、細胞集団に注意すること。

4) 網の目状の細胞質を有する腺癌細胞は、組織球と類似することがあるから見誤らないこと。

5) 小細胞型未分化癌細胞もリンパ球もともに核が濃縮することが多いので両者を見誤らないこと。

以上のどの項目も必ず強拡大にて観察することが必要である。

VI. 集検への応用

100 ml のポリエチレンの容器に 50 ml の Saccomanno 液を入れて、被検者に渡し、3 日間の喀痰をその容器に喀出させる。この場合 Saccomanno 液と喀痰をよく混和するように注意しておく。

現在、われわれは A, B, 2 事業所に本法を用いて喀痰細胞診による集検を行った。検査した材料は 295 例であったが、現在のところ、癌細胞の認められた症例はない。

われわれは、一昨年 A 事業所の喀痰細胞診に 0.5% ホルマリン液を被検者に渡して、その中に喀痰を喀出させ、2~3 回提出させた。昨年は同一事業所を対象とし、

表 3 同一事業所を対象とし、喀痰細胞診による
集検を行った場合の0.5%ホルマリン法と
Saccomanno 法における組織球出現率

	検査例数	組織球 出現例数	組織球 出現率
0.5%ホルマリン法 (2~3回提出)	78	54	69.2%
Saccomanno 法 (2~3日間蓄痰)	65	57	87.7%

Saccomanno 法で集検を行い組織球の出現率を比較したところ、表3に示すように0.5%ホルマリン法69.2%、Saccomanno 法87.7%であり、組織球の検出率は18.5%上昇した。

VII. 考 察

喀痰に蛋白分解酵素を作用させて喀痰を溶解し、その中から癌細胞を見つけ出す方法、すなわち集細胞法は1960年頃発表されたが^{3,4,7,9)}、操作が複雑なわりに、よい結果が得られなかったため、これらの方法は普及しなかった。これに対して、われわれが紹介した Saccomanno 法は操作が非常に簡単のため、Mayo Lung Project でとりあげられたものと考えられる^{1,2)}。本法については高橋が1971年に紹介⁸⁾しているが、実際にどのように行うかについては記載されていない。また1963年の Saccomanno の報告⁵⁾をみてもどのような装置が必要なのか、どのように行うのか、どのような細胞所見を呈するかについては記載されていない。本論文では、Saccomanno 法を紹介するとともに、その方法を用いて行った喀痰細胞診の成績および細胞所見について述べた。

従来の集細胞法では、喀痰の保存という点については見逃されていた感じがある。しかし、集検という立場を考えると喀痰をその日のうちに固定することは不可能なことが多く、喀痰の保存ができれば集検には極めて便利である。われわれは直接病巣を擦過して得た材料について、Saccomanno 液に保存し、経過を追って観察したが、本液に浸すことによって行った細胞変性は1ヵ月経過しても、次第に強くなることがなかった。扁平上皮癌細胞はほとんど変性をきたすことはなく、腺癌細胞は細胞質とクロマチンパターンに、小細胞型未分化癌細胞はクロマチンパターンに変性所見がみられたが、細胞診断に支障をきたす程ではなく、喀痰中にみられる腺癌細胞や小細胞型未分化癌細胞の細胞形態とそれほど大差はない。したがって本液を用いて喀痰を長期間保存することは可能であると考えられる。

本液の組成は50%エタノールが主成分であるが、カー

ボワックス1540を加えるのは、Saccomanno によれば、標本作成の際の乾燥による細胞の収縮を防ぐためであるという。また本法は操作が非常に簡単で標本作成に要する時間は20分以内である。したがって、container さえ多く揃えれば、一度に多数の検体を取り扱うことができる。集検の場合は陰性例が多いため、使用した container は直ちに水洗して、再び使用する。このようにすれば container が10個あれば80~100件の喀痰を処理し、染色まで行うことができる。

本法にて喀痰細胞診を行い、同一材料で直接塗抹法と比べた結果、陽性率が18%上昇した。しかしながら、喀痰細胞診陽性率は64.1%にとどまった。これは、例数が少ないことと、たまたま早期末梢型肺癌症例が多かったことによると思われるが、決して満足すべき成績でない。今後、多数の症例について検討する必要があるが、Saccomanno 自身も述べているように⁹⁾、喀痰細胞診陽性率の向上のためにはどうしても喀痰誘発法が必要である。

集検例について、同一事業所を対象に本法を用いて喀痰細胞診を行ったが、組織球の出現率は87.7%であり、従来の方法よりも多いと考えられるが、なお検体不良例もあることから、喀痰誘発法が望ましいといえる。

癌細胞の形態学的特徴については、Saccomanno 液に保存することによる細胞変化に加えて、ブレンダーで攪拌することにより、細胞集団としての特徴が失われ、腺癌細胞が散在性の傾向をとり、小細胞型未分化癌細胞は逆に集合する傾向がある（この理由はよくわからない）。また、腺癌細胞では細胞質がやや厚くなり、クロマチンが粗くなったりして扁平上皮癌細胞との鑑別に迷うこともある。

したがって、本法は細胞形態の微細な観察や治療による細胞変化の追求などには適さないし、細胞型の決定にも十分な情報を与えてくれるとはいえない。あくまで1次スクリーニングに用いるべきで、肺癌と診断の確定した症例のその後の検索には用いる必要はない。

われわれは Saccomanno の集細胞法を紹介したが、本法は喀痰の長期間の保存が可能であり、操作が簡単で、かつ細胞診陽性率を向上させ得ることから、喀痰細胞診の第1次スクリーニングに適しているものと思われる。

稿を終えるにあたり、松田が渡米に際し、種々のご援助をいただいた日本学術振興会に深謝する。

Summary

In this paper is presented the method of sputum cytology which was developed by Saccomanno. This method has been used in the Mayo Lung Project in U.S.A.

Comparison between the cellular features of direct smears obtained by the transbronchial brushing or the needle aspiration technique, and of smears that had remained in Saccomanno's solution for 1, 2 and 4 weeks showed that epidermoid carcinoma cells did not exhibit much evidence of degeneration, but that adenocarcinoma cells and small cell anaplastic cell carcinoma cells did exhibit some appreciable degree of cellular damage. Cytologic examination, however, was capable of identifying whether they were cancer cells or not.

In the authors' laboratory, sputum cytology was performed in 39 cases of lung cancer by Saccomanno's concentration method, and comparison between this method and direct smear was studied. The cytologically positive rate was elevated by 18.0%, compared with the direct smear in the same specimens.

Morphologic characteristics of cancer cells by Saccomanno's concentration method were observed. Epidermoid carcinoma cells were similar to those found by the direct smear. Adenocarcinoma cells were somewhat different from direct smear cells, that is, irregular overlapping of cells was hardly visible, and scattering of cells was increased; thick cytoplasm was common; chromatin was rather coarsely distributed. In small cell anaplastic carcinoma cells, also chromatin distribution was coarse, and cell clumping was more striking.

Since this is a rapid, simple method that permits atypical cells to be readily found, 295 people were screened by chest X-ray and sputum cytology using this method. The sputum cytologic tests utilized 3-day pooled collections of spontaneous sputum. At this point, cancer cells have not yet found, though it may be

said that the frequency of discovery of histiocytes in these specimens was higher by 18.5% than in the cases where direct smears were employed.

文 献

- 1) Fontana, R.S., Sanderson, D.R., Miller, W.E., Woolner, L.B., Taylor, W.F. and Uhlenhopp, M.A.: The Mayo Lung Project: Preliminary report of "early cancer detection" phase, *Cancer*, 30: 1373~1382, 1972.
- 2) Fontana, R.S., Sanderson, D.R., Woolner, L.B., Miller, W.E., Bernatz, P.E., Payne, W.S. and Taylor, W.F.: The Mayo Lung Project, for early detection and localization of bronchogenic carcinoma, A status report; *Chest*, 67: 511~522, 1975.
- 3) Knudtson, K.P.: Mucolytic action of hyaluronidase on sputum for the cytological diagnosis of lung cancer, *Acta Cytol.*, 7: 59~61, 1963.
- 4) Pharr, S.L. and Farber, S.M.: Cellular concentration of sputum and bronchial aspirations by tryptic digestion, *Acta Cytol.*, 6: 447~454, 1962.
- 5) Saccomanno, G., Saunders, R.P., Ellis, H., Archer, V.E., Wood, B.G. and Beckler, P.A.: Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum, *Acta Cytol.*, 7: 305~310, 1963.
- 6) Saccomanno, G.: Cytological diagnosis of cancer of the lung, *American Society of Cytology—Pulmonary work shop*, San Juan, Puerto Rico, 1975.
- 7) Takahashi, M. and Urabe, M.: A new cell concentration method for cancer cytology of sputum, *Cancer*, 16: 199~204, 1963.
- 8) 高橋正宜: 細胞診教本, p. 131, 宇宙堂八木書店, 東京, 1971.
- 9) Umiker, W., Young, L. and Waite, B.: The use of chymotrypsin for the concentration of sputum in the cytologic diagnosis of lung cancer, *Univ. Mich. Med. Bulletin*, 24: 265~267, 1958.

図 1 肺穿刺により得られた腺癌細胞 (直接塗抹). 細胞質辺縁は不明瞭. 核は濃染し, 核縁は薄く明瞭である. クロマチンは微細顆粒状である (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 2 図 1 と同一検体で Saccomanno 液に 4 週間保存後, 作成した標本中の腺癌細胞. 図 1 に比べてクロマチンはやや粗く, 核小体は明瞭である (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 3 ブロンコ・ファイバースコープで採取した小細胞型未分化癌細胞 (直接塗抹). ほとんど裸核状態でクロマチンは細顆粒状で, 小さい核小体が散見される (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 4 図 3 と同一検体で, Saccomanno 液に 4 週間保存後の標本中にみられた小細胞型未分化癌細胞. 図 3 に比べて核縁はやや不正肥厚し, クロマチンはやや粗い (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 5 Saccomanno 法に使用する機械.
左: サーモミキサー, 右: ブレンダー

図 6 塗抹標本.
上: 直接塗抹法, 下: Saccomanno 法

図 7 直接塗抹標本にみられた線維様物質.
(Pap. 染色 $\times 200$)

図 8 図 7 と同一材料を, Saccomanno 法にて処理
したもの (Pap. 染色 $\times 200$).

図 9 線毛上皮細胞 (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 10 組織球. 左は炭粉を貪食し, 右は炭粉を貪食
しない (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 11 Saccomanno 法による扁平上皮癌細胞.
背景にみられる細胞は均等に分布し, その
中に 1 つ, 濃染した細胞がみられる.
(Pap. 染色 $\times 100$)

図 12 図 11 の強拡大. 2 核の扁平上皮癌細胞. N/C 比
は大きく, 細胞質辺縁, 核縁ともに明瞭で濃染
した細胞. クロマチンは粗大凝集している.
(Pap. 染色 $\times 1,000$)

図 13 Saccomanno 法による扁平上皮癌細胞で、平面的な配列を示す (Pap. 染色 $\times 400$).

図 14 平面的配列を示す扁平上皮癌細胞の小集団. 細胞質辺縁, 核縁は明瞭で, クロマチン・パターンは各細胞で異なる (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 15 Saccomanno 法による腺癌細胞. 扁平上皮癌細胞, 白血球を背景に濃染した2核の腺癌細胞がみられる (Pap. 染色 $\times 100$).

図 16 図 15 の強拡大. 細胞質は濃染し, 細胞質縁は明瞭で, 一見扁平上皮癌細胞と見誤るような腺癌細胞である (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 17 腺癌細胞の集団. 平面的配列した小集団と, 立体的配列した集団が混在し, 核は濃染している (Pap. 染色 $\times 400$).

図 18 2核の腺癌細胞. 細胞質, 核は淡染しており, 細胞質辺縁は不明瞭で, 細胞質は網の目状である. 核小体は大きいものが1つ認められる. (Pap. 染色 1,000)

図 19 Saccomanno 法による扁平上皮癌細胞。散在性にみられる角化扁平上皮癌細胞。核形不整でクロマチンは粗顆粒状である。(Pap. 染色 1,000)

図 20 Saccomanno 法による腺癌細胞。泡沫状の細胞質を有するが、クロマチンは粗顆粒状を呈する (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 21 Saccomanno 法による腺癌細胞。平面的な配列をなし、細胞質辺縁はやや不明瞭である。核は濃染し、クロマチンは粗である。(Pap. 染色 $\times 1,000$)

図 22 Saccomanno 法による小細胞型未分化癌細胞。散在性に分布し、裸核様。クロマチンの濃縮したものが多数みられる。(Pap. 染色 $\times 1,000$)

図 23 Saccomanno 法による小細胞型未分化癌細胞。平面的な配列をなして小集団を形成している (Pap. 染色 $\times 1,000$).

図 24 図 23 の強拡大。細胞質辺縁は明瞭である。核は濃染したものと、淡染したものが混在する。核は円形または類円形で、核縁は明瞭。クロマチンは細顆粒状である。(Pap. 染色)

図 25 立体的配列を示す小細胞型未分化癌の細胞集団 (Pap. 染色 $\times 100$).

図 26 図 25 の強拡大。細胞質は不明瞭である。核形は不整でパラエティーに富んでいる。クロマチンは濃染したもの、粗顆粒状のものが混在している (Pap. 染色 $\times 1,000$).