 原 著

簡易 Saccomanno 変法による喀痰細胞診

中尾内科 国立南福岡病院
中尾 清 篠原 利光

国立病院九州がんセンター
西 国広 園田 文孝

浜の町病院 国立福岡中央病院
戸上 七郎 筒井 康子

1. はじめに

喀痰細胞診の検出率向上のための集細胞法がいろいろ報告^{7,9,11)}されているが、成瀬ら⁵⁾は本誌上でSaccomanno法の具体的実施法を紹介し、その成績を報告している。しかしそれに使用されるブレンダーは必ずしも簡単に入手しがたいこと、またその目的が喀痰の均質化にあることから、われわれは細胞に与える物理的影響を少なくすることを期待して緩徐な攪拌法を考え、手近な材料でブレンダーを作ったので簡易 Saccomanno 変法（簡サと略記）として紹介する。また共同発表者のひとり（篠原）は日本精機製の homogenizer が Saccomanno 原法のブレンダーと性能的に類似していると考え、これを用いて同一検体を処理しその細胞所見を直接塗抹、簡サと比較したので報告する。

2. 喀痰の保存

喀痰はすべて Saccomanno 液⁹⁾（50% エタノールに2%の割にカーボワックスを加えたもの）に保存した。その期間は3~10日間である。

3. 簡易ブレンダーの構造と機能

図1に示すとおり模型用モーター RE 26（マブチモーター社、日本）に金属シャフトを接続し、その先端近くに2根羽根のスクリューを2個上下、直角に固定する。モーターとシャフトの間にスプリングジョイントを用いると、シャフトが小さな弧を描いて回転し、攪拌効果が大きくなる。単3電池2個を直列式に作動させると6,000 rpm（タコメーターで測定）で回転する。検体を入れたガラス容器にこれを取りつけ、間に厚紙の蓋をはさみ、約30秒攪拌するとエマルジョンを得る。

厚紙はその都度とりかえる。使用後シャフトの部分を回転させながら流水中で、次いで消毒液、また流水中で2,3分ずつ洗浄して乾燥させる。消毒液にはハイミンT液を100倍にうすめて用いた。器具の高さは20 cm、重さは140 gである（図1）。

4. Homogenizer の構造と機能

homogenizer（HGと略記）は写真2に示す金属の爪状スクリューを検体容器内に降ろし、2,000回転で約10秒作動させると喀痰は完全に均質化される。なおこの装

Simplified Saccomanno Technique for Sputum Cytology

Kiyoshi NAKAO, M.D.
Nakao Clinic
Toshimitsu SHINOHARA, C.T., J.S.C.C.
National Minami-fukuoka Hospital
Kunihiro NISHI, C.T., I.A.C. and Fumikata SONODA, C.T., I.A.C.
Kyushu Cancer Center Hospital
Hichiro TOGAMI, C.T., I.A.C.
Hamanomachi General Hospital
Yasuko TSUTSUI, C.T., I.A.C.
National Fukuoka-chuo Hospital
昭和53年5月25日受付

図1 簡易ブレンダーの構造

置は変速可能である。

5. 固定と染色

上記のエマルジョンを1,500回転5分間遠沈し、Saccomanno 原法に従って沈渣をサーモミキサーにかけ、その1,2滴をスライドガラス上にのせ、すり合わせ方式で塗抹した。

標本の厚さは当然鏡検の難易に影響する。写真3ではやや細胞数が多すぎ、Saccomanno 原著⁹⁾に準じた写真4(同一例)の方が適当な細胞散布がみられる。標本を乾燥させたのち、下記の要領でパパニコロウ染色を施した。

- (1) 95% エタノールで10分固定
- (2) 流水中で5分洗浄
- (3) Harris Hematoxylin 1分染色
- (4) 水洗1分
- (5) 0.3% 塩酸水溶液で分別, 5秒
- (6) 流水で色出し, 3分
- (7) 95% エタノールを2回通す
- (8) OG-6, 3分
- (9) 95% エタノールを2回通す
- (10) EA 65, 2分

- (11) 95% エタノールを2回通す
- (12) 純エタノールを2回通す
- (13) キシロールで透徹, 封入

6. 成績

簡サとHGとの細胞所見は同じなので一括して述べる。癌細胞の出現および分布状態には両者の間に若干の差が見られたが、その点については後述する。

1) 弱拡大

線維様物質は切断され、粘液が減少するので上皮細胞、白血球が均等に分布してみられる。直接塗抹よりうすく塗抹されているので細胞の重積がほとんどなく観察しやすい。

2) 正常細胞

諸種の上皮細胞は直接塗抹標本にみられる所見と変わらない。組織球は細胞質が淡染し、その辺縁がやや不明なものが多かった。

3) 扁平上皮化生細胞

扁平上皮化生細胞を観察するため扁平上皮癌3例(case 16, 64, 92), 小細胞型未分化癌1例(case 107)および大細胞型未分化癌1例(case 131)につき各1枚の簡サ標本の全視野の扁平上皮化生細胞数をできるだけSaccomanno¹⁰⁾の判定基準に従って、異型なし、軽度、中等度、高度の4型に分類を試みた(表1)。判定のばらつきをさけるため共同発表者のひとり(中尾)が鏡検分類した。

扁平上皮化生細胞には集団を形成するものと孤立性のものがあり、前者は4~9個の多稜形細胞が敷石状に集合し、軽度の大小不同がみられた。異型度の低い化生細胞では細胞質はかなり豊富で厚く、細胞辺縁は明瞭、好塩基性のものが多かった。核は類円形で濃染する。異型度の高いものは孤立性細胞が多く、細胞質の辺縁はやや不明瞭で、N/C比が大きく、核形不整で核縁は不均等に

表1 扁平上皮化生細胞の出現状態

Case No.	Type	Regular	Mild	Moderate	Marked	Total
16		24	15	6	3	48
64		24	13	9	5	51
92		1	2	1	0	4
107		1	0	0	0	1
131		23	7	1	0	31

* Case 16, 64, 92: 扁平上皮癌
Case 107: 小細胞型未分化癌
Case 131: 大細胞型未分化癌

肥厚し、核小体を認めるものもあった。

4) 扁平上皮癌細胞

細胞質は厚く、辺縁明瞭である。核は濃染し核縁不整、クロマチンは粗顆粒状で、ときに 1, 2 個の核小体を認める。写真 5, 6 は明るい背景の中で容易に識別された散在性の扁平上皮癌細胞である。

扁平上皮癌 3 例について直接塗抹、簡サ、HG の標本を 400 倍率で無作為の 30 視野について検索した癌細胞の数を表 2 に示す（細胞数 1 個以下の視野は除外した）。Case 16 のみは HG を施行していないが、他の 2 例では直接塗抹に比べ簡サ、HG に出現率が高かった。

5) 腺癌細胞

腺癌細胞は主として集団をつくるが、直接塗抹に比べ重積性が少なかった。HG では一部に重積性がみられた。少数ながら散在する単個の腺癌細胞も認めた。細胞質は濃染するものと淡染するものがあり、その辺縁は不明瞭である。核縁は一部肥厚するものもあるが、大多数は肥厚せず不整で、クロマチンは細顆粒状、または粗顆粒状で好酸性のかなり大きな核小体を 1 個認めた（写真 7, 8）。

腺癌 6 例について 100 倍率で、無作為の 30 視野中の 2 個以上の腺癌細胞の集団数（個々の細胞数ではない）を調べた（表 3）。

case 87 は例外的に細胞集団が少なく、癌細胞は散在していた。case 82 は直接塗抹のほうが多く癌細胞集団がみられたが、残りの 4 例では簡サ、HG に多くみられた。

6) 小細胞型未分化癌細胞

簡サでは疎な集団、HG ではやや密な集団をつくる傾向がみられた。これら集団は大小不同の裸核細胞からなっているが、直接塗抹に比べ、核の融解または濃縮が著しく、核は濃淡不均等に染まり、小さな核小体を認めるものが多かった（写真 9, 10）。変性した良性上皮細胞（写真 11, 12）と紛わしいものもあった。

7) 大細胞型未分化癌細胞

直接塗抹で証明された 2 例を簡サ、HG で観察すると、1 例は高度の異型扁平上皮化生細胞と鑑別が困難であった。細胞質は淡い好酸性、細胞質辺縁は不明瞭、核

表 2 扁平上皮癌細胞数（×400, 30 視野）

Case No.	直接塗抹	簡 サ	H G
16	18	42	／
64	7	20	13
92	6	9	14

表 3 腺癌細胞集団数（×100, 30 視野）

Case No.	直接塗抹	簡 サ	H G
28	8	17	66
82	16	5	8
87	0	3	0
114	9	11	54
116	0	2	6
120	7	15	120

表 4 直接塗抹、簡サ、HG で比較した癌細胞所見

	細胞配列		細胞辺縁	細胞染色性	細胞質性状	核縁	核クロマチン	核小体大きさ	核小体数
扁平上皮癌細胞	直接塗抹	散在性	明瞭	多彩	重厚	不整、粗剛	粗顆粒状	認めにくい	
	簡サ	"	"	"	"	"	"	小	1~2個または認めにくい
	H G	"	"	"	"	"	"	"	"
腺癌細胞	直接塗抹	立体的	不明瞭	青緑	淡明泡沫状	うすい	微細顆粒状	大	1 個または認めにくい
	簡サ	平面的	"	"	単個細胞ではときに裸核	"	細顆粒状	"	"
	H G	一部立体的	"	"	"	"	細顆粒または粗顆粒	"	"
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	うすい	細顆粒状	小	1~2個または認めず
	簡サ	疎な集合	"	"	"	"	融解または濃縮	"	"
	H G	やや密な集合	"	"	"	"	"	"	"
大細胞型未分化癌細胞	直接塗抹	散在性	不明瞭	淡青	淡明	不整、厚い	粗顆粒状増量せず	大	1~2個
	簡サ	"	ときに明瞭	多彩	やや重厚	"	粗顆粒状増量す	"	"
	H G	"	"	"	"	"	"	"	"

は多型性、クロマチンは粗顆粒状で、核小体が1~2個みられた(写真13, 14)。

また別の1例では非角化扁平上皮癌細胞との区別がつけがなかった。細胞質は好塩基性で重厚、N/C比がかなり大きく、類円形の核は濃染して粗顆粒状のクロマチンがみられ、核縁は肥厚していた。核小体は明瞭でなかった(写真15)。

これに対し直接塗抹の細胞所見は細胞質は淡青、N/C比はきわめて大きく、不整形の核縁にクロマチンの凝集がみられたが、核は濃染せず、好酸性の核小体が明瞭に認められ、上述の簡サ、HGの所見とはかなり異なっていた。

以上の癌細胞所見を直接塗抹、簡サ、HGの3法で比較したものを表4にまとめた。

7. 考 察

Saccomannoの集細胞法⁹⁾の具体的実施法は成瀬ら⁵⁾によって本誌に紹介された。この方法は操作が簡単であり、ことに喀痰を保存する集検に適しているので、ひろく米国で採用されているようである。

われわれはこの集細胞法の一連の操作のうち、攪拌だけでもっと簡単な装置で代用できるのではないかと考え、簡単に安価なブレンダーを試作した。回転速度はSaccomanno原法のブレンダーの約1/3だが、30秒攪拌すると完全に均質化したエマルジョンを得ることができた。Saccomanno原法で用いるブレンダーが入手できなかったのも、これと性能が類似していると考えられる国産のhomogenizerを用い、112検体について集細胞の効果を検討し、細胞所見を比較した。

Saccomanno⁹⁾らは扁平上皮化生細胞と扁平上皮癌との因果関係を強調している。われわれは扁平上皮癌、小細胞型未分化癌、大細胞型未分化癌について異型度分類を試みた。もとより症例が少ないので結論は出せないが、化生細胞の数は症例によってまちまちのようであり、異型なしの化生細胞が多くみられ、異型度の高いものほど少ないような傾向を示した。

Saccomanno自身は彼の集細胞法で扁平上皮化生細胞が集団として保たれると報告⁹⁾しているが、Nasiell⁶⁾はSaccomanno法の短所として扁平上皮化生細胞が単個で出現することが多いので、直接塗抹より同定や異型度判定が困難であると指摘している。われわれも孤立した化生細胞と、本来の扁平上皮起源の細胞との鑑別がむずかしいことを経験した。扁平上皮化生細胞の出現状態や異型度分類についてもっと症例を重ね、攪拌法を変えるな

ど検討してみたい。一方、直接塗抹では細胞が重積したり、背景の汚ない部分があったりして、全視野の化生細胞を数量的に算定して簡サのそれと比較することは到底できなかった。

扁平上皮癌細胞は直接塗抹と所見はほぼ同じである。腺癌細胞は重積性が少なくなり、単個細胞として認めるものもある。クロマチンパターンに軽度の変性がみられる。

小細胞型未分化癌細胞は核の融解または濃縮が直接塗抹に比べて著しく、核内構造は不明瞭なものが多く、良性の上皮細胞との鑑別に注意を要することがある。

大細胞型未分化癌細胞では直接塗抹の癌細胞と、簡サ、HGの癌細胞とはかなり特徴の相違がみられたが、わずか2例なのでその理由はわからない。

扁平上皮癌例と腺癌例について直接塗抹、簡サ、HGの数量的比較を行い、簡サ、HGに集細胞効果を認めた。集細胞効果に大きな役割を果たしているのは“明るい背景”である。

攪拌と遠沈による線維物質の切断、粘液の除去によって細胞の識別は直接塗抹よりかなり速く、かつ容易となる。

今回の症例は数も少なく、その目的は陽性率の向上でなく、簡易ブレンダーが攪拌の役目を果たしうるか否かを検討するためであった。

上記の成績から、この簡易ブレンダーは一応その目的にかなうので試用する価値があると考ええる。

(顕微鏡写真はいずれも簡サによる)

ご教示を賜った国立病院九州がんセンター大田満夫副院長に深謝するとともに、多大のご協力を頂いた浜の町病院白川充検査科部長に厚くお礼申し上げます。

Summary

According to the principle of the Saccomanno technique, a simplified device was made for cell collection of sputum. It consists of a small motor, springjoint, metal shaft, a pair of screws and two batteries (SUM-3/1.5 V). It measures 20 cm long and weighs only 140g. Stirring the specimen for 30 seconds at about 6,000 rpm produces complete emulsion of sputum.

The authors tentatively designate it "Simplified Saccomanno Technique" (S.S.). A homogenizer (HG) was also adopted for comparison. Its function is similar to Saccomanno's original blender. One hundred twelve specimens taken from 95 patients who had been suspected of

lung cancer were examined by means of direct smears, S.S. and HG. Thirteen out of the 95 patients proved to have cancer. Numerical evaluation was made on squamous carcinoma and adenocarcinoma group. Generally, in S.S. and HG slides there were more malignant cells per unit slide area than in direct smears of the same specimen.

As to small anaplastic carcinoma, identifying cells would seem to be easier on direct smear, but it was not as simple as might be thought on S.S. and HG because of the change in nuclear pattern. Degenerated benign epithelial cells were likely to be mistaken for small anaplastic carcinoma cells. The characteristics of large cell carcinoma appeared in S.S. and HG were quite different from those in direct smear.

An attempt was made to classify the grade of atypia of squamous cell metaplasia according to Saccomanno's criteria on each slide of squamous carcinoma, small anaplastic carcinoma and large cell carcinoma totaling to 5 cases. The number of metaplastic cells seems to vary with the case. Occasionally it was difficult to differentiate single metaplastic cells from the cells of squamous epithelium origin.

This S.S. method, like the Saccomanno technique, facilitates the recognition of the cells in clear background. Since the effect of this simple blender was confirmed to certain extent, it would be worth utilizing this device for cell collection.

文 献

- 1) Chang, J.P., Anken, M. and Russell, W.O. : Sputum cell concentration by membrane filtration for cancer diagnosis, *Acta Cytol.*, 5 : 168~172, 1961.
- 2) 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.
- 3) Fontana, R.S., Sanderson, D.R., Miller, W.E., Woolner, L.B., 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.
- 4) 服部正次・他 : 細胞診断図譜, pp. 148~192, 医歯薬出版, 東京, 1970.
- 5) 成瀬靖悦, 松田 実 : Saccomanno 法による喀痰細胞診成績, *日臨細胞誌*, 16 : 195~199, 1977.
- 6) Nasiell, K. : Mass Screening For Lung Cancer, pp. 44~51, *Proceedings of 6th International Congress of Cytology*, Tokyo, 1977.
- 7) Pharr, S.L. and Farber, S.M. : Cellular concentration of sputum and bronchial aspirations by tryptic digestion, *Acta Cytol.*, 6 : 447~454, 1962.
- 8) Rome, D.S. and Olson, K.B. : A direct comparison of natural and aerosol-produced sputum collected from asymptomatic men, *Acta Cytol.*, 5 : 173~176, 1961.
- 9) Saccomanno, G., Sanders, R.P., Ellis, H., Archer, V.E., Wood, B.G. and Becker, P.A. : Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum, *Acta Cytol.*, 7 : 305~310, 1963.
- 10) Saccomanno, G., Archer, V.E., Auerbach, O. and Sanders, R.P. : Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells, *Cancer*, 33 : 256~270, 1974.
- 11) Takahashi, M. and Urabe, M. : A new cell concentration method for cancer cytology of sputum, *Cancer*, 16 : 199~204, 1963.

写真 1 簡サの装置

斜上から撮ったのでシャフトが曲がって見える。

写真 2 homogenizer の装置

金属シャフトの先端の短い爪状スクリューを下の容器内に降ろして攪拌する。

写真 3 1視野の細胞数が多すぎてスクリーニングに時間がかかる ($\times 100$).

写真 4 写真3と同一症例
適当な細胞の散布状態である ($\times 100$).

写真 5 明るい背景の中に扁平上皮癌細胞が容易に識別される ($\times 100$).

写真 6 写真 5 の強拡大

N/C 比の大きい 2 個の細胞は細胞質厚く、核辺縁不整、クロマチンは粗顆粒状である ($\times 1,000$).

写真 9 小細胞型未分化癌細胞

小集団を形成し、裸核で濃染、細胞の大小不同著明 ($\times 100$).

写真 7 明るい背景の中央に腺癌細胞集団
重積性は乏しい ($\times 100$).

写真 10 写真 9 の強拡大

クロマチンの濃縮ないし融解があり核縁がぼけている ($\times 1,000$).

写真 8 写真 7 の強拡大

細胞質の辺縁不明瞭、核小体は大きく明瞭である ($\times 1,000$).

写真 11 変性した円柱上皮細胞で裸核様

写真 9 に似ており、この倍率で見誤るおそれがある ($\times 100$).

写真 12 写真 11 の強拡大

裸核が濃染し、小細胞未分化癌細胞に似ているが、大小不同がなく核縁は円滑 ($\times 1,000$).

写真 14 写真 13 の強拡大

細胞質の辺縁不明瞭。核は 1 個は不整形、他の 1 個は類円形で、いずれも濃染し、クロマチンは粗顆粒状で核小体は 1~2 個認める。高度異型扁平上皮化生細胞と鑑別しがたい ($\times 1,000$).

写真 13 中央に 2 個の扁平上皮化生細胞と思われる細胞がみられる ($\times 100$).

写真 15

細胞質は厚く、一部空胞化。核縁の肥厚、粗顆粒状のクロマチン。非角化扁平上皮癌細胞との鑑別困難 ($\times 1,000$).