原 著

ヘルペス感染症の診断における toluidine blue 染色の応用

東京女子医科大学産婦人科教室

和 田 順 子 木 村 祐 子 小 倉 ま き 子
栗 林 伸 子 河 西 洋 篠 崎 百 合 子

外陰ヘルペスの診断のため、それを疑わせる患者 30 名を対象に toluidine blue 染色を施した細胞診標本, Tzanck smear, を作製し, Pap 染色や Giemsa 染色標本と比較した. 細胞所見として巨大多核細胞の出現, 核内クロマチンの grey degeneration をヘルペス感染の診断基準とした. 同時に血清中の抗体価測定を行い検討した.

その結果, 血清抗体価の上昇したもの 20 例 (66.7%), 上昇を示さないもの 10 例 (33.3%) であり, 細胞診陽性は 19 例 (63.4%), 陰性 11 例 (33.6%) であった. 細胞診標本の全例において Pap 法, Tzanck 法ともに一致した診断を得た. Tzanck 法は検体の採取から診断まで 2 分間のうちに, 簡単な操作で, 信頼できる結果が得られるため, 重篤で多彩な症状を呈するヘルペスの急性感染症のみならず, 予後不良な産道感染の予防など日常の診療にきわめて有用である.

なお東京女子医科大学産婦人科および母子センターにおけるヘルペス患者は 0.14~0.68% の発生頻度である.

Key words : Vulvitis—Herpes—Tzanck test—Toluidine blue

I. 緒 言

産婦人科領域におけるヘルペス感染症の診断には, 日常の診療においては確実, 迅速であることから細胞診の使用が最も実用的であり^{2,7-9)}, 通常は Papanicolaou 染色 (以下 Pap 法と略) による方法が採られている. 一方, toluidine blue による染色 (以下 Tzanck 法と略) を細胞診断に使用することはすでに 1948 年 Tzanck らにより記載されているが^{4,5)}, これまで臨床的に使用することはあまり多くはなかった. Solomon ら⁵⁾は, 皮膚科領

域のヘルペス患者に Tzanck 法による検査を施行して, 2 分間のうちに信頼できる結果の得られることを報告している. しかし外陰ヘルペスに Tzanck 法を使用した論文は, 検索しえた範囲では見当らなかったため, 著者らは産婦人科領域におけるヘルペス患者を対象にその有用性を検討した.

II. 研究対象と方法

外陰部や陰にヘルペス感染症を疑わせる所見を呈する患者 30 名から, frosted slide glass を使用して捺印または擦過細胞診標本を作製した. 発疹がびらん, 潰瘍の時期ならそのまま, 水疱や痂皮を形成しているなら清潔にその表皮や痂皮を除き, 検体を採取した. 空気乾燥による固定後, 0.1% toluidine blue 液で 15~30 秒染色, 流水中で水洗, 乾燥, 封入を行い鏡検した (表 1). 多核巨大細胞, 核内クロマチンの grey degeneration の出現をその診断基準とした (表 2). 同時に Pap 法を, 一部には Giemsa 染色を追加した. また初診時に血清中の抗体価を測定し, 陰性の症例には 2 週間後, 再度検査を

The tzanck smear in the diagnosis of herpes vulvitis
Yoriko WADA, M.D., M.I.A.C., Yuhko KIMURA,
C.T., I.A.C., Nobuko KURIBAYASHI, M.T., Makiko
OGURA, M.D., Hiroshi KASAI, M.D., Yuriko SHINO-
ZAKI, M.D.

Dept. of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Women's
Medical College

論文別刷請求先 ㊦162 東京都新宿区河田町 8 の 1 東京女子医科大学産婦人科医局内 和田順子

昭和 60 年 8 月 16 日受付

昭和 61 年 2 月 21 日受理

表1 Tzanck smear の作製法

1. 検体採取
2. 空気乾燥
3. トルイジンブルー液滴下 15秒
4. 流水で洗浄
5. 空気乾燥, 封入
6. 鏡 検

表2 Tzanck smear の診断基準

1. 巨大多核細胞
2. すりガラス状の染色体分布

行った。

III. 結 果

1981年1月から1985年7月まで, 東京女子医科大学病院産婦人科および母子総合医療センター外来を初診した患者のうち, 外陰ヘルペスと診断されたものは表3のごとく, それぞれ9名(0.14%), 11名(0.15%), 20名(0.23%), 37名(0.68%), 16名(0.48%)であり, sexually transmitted diseases の代表といわれる本症の患者の増加傾向は明白である。外陰部や陰に発疹を認め, 疼痛, 搔痒感, 帯下, 出血, 発熱, 排尿や歩行困難, 所属リンパ節の腫脹などを訴え, ヘルペス感染を強く疑わしめる患者から Tzanck 法, Pap 法, 血清抗体価測定を行ったところ, 結果は表4, 5の如くであった。すなわち血清抗体価の上昇をきたしたものは20例(66.7%)であった。細胞診では19例(63.3%)に典型的なヘルペス感染細胞が出現した(写真1~3)。血清抗体価の上昇と細胞診所見において positive correlation を示したものは16例(53.4%), negative correlation は7例(23.3%)であった。表4に示す抗体価上昇の有無について細胞所見との間で chi-square test を行ったところ, 有意な相関がみられた($p < 0.01$)。

細胞診標本のうち19例(63.4%)には巨大多核細胞, 核内クロマチンの grey degeneration, nuclear molding などが写真1~3の如く Pap 法, Tzanck 法, Giemsa 染色ともに著明であった。Pap 法と Tzanck 法は全例とも一致した結果であった(表5)。Solomon ら⁵⁾によれば Pap 法では好酸性核内封入体が散見されるが, toluidine blue 染色ではエオジンを使用しないため核内封入体は染まらないとされている。しかしながら封入体の存在を思わせる核内所見は観察された。Toluidine blue 染色時間は Tzanck らによる原法は15秒であるが, 著者の検討では45秒染色が最も適当であった。

表3 ヘルペス外陰炎の発生・頻度

年	1981	1982	1983	1984	1985 (7月まで)
外来患者総数	6,622	7,130	7,250	5,446	3,315
ヘルペス 外陰炎患者数	9	11	20	37	16
%	0.14	0.15	0.23	0.68	0.48

(東京女子医大産婦人科, 母子センター)

表4 抗体価上昇と細胞所見の相関 N=30

	細胞所見 (+)	(-)
抗体価上昇 (+)	16 (53.4%)	4 (13.3%)
(-)	3 (10.0%)	7 (23.3%)

表5 抗体価と細胞診 N=30

抗体価上昇	20例 (66.7%)
細胞所見 (+)	19例 (63.3%)
Pap smear Tzanck smear	全例一致

写真1 ヘルペス感染細胞 (Tzanck stain, ×400)

写真2 ヘルペス感染細胞 (Pap stain, ×400)

写真 3 ヘルペス感染細胞 (Giemsa stain, $\times 400$)

IV. 考 按

ヘルペス感染症の診断に際して細胞診検査が行われるが、これには通常 Pap 法の標本が用いられる。Pap smear の場合、検体採取から鏡検まで 10 分余を要し、染色用器具も多く、操作がいささか複雑であり、標本枚数が少ない場合には簡便であるとはいいがたい。今回、著者らは toluidine blue 染色法による Tzanck smear を使用して Pap smear との相関を調べたところ、完全に一致する診断結果を得た。Tzanck 法は検体の採取、処理、鏡検まで 2 分以内で終了するため、日常の外来診療には大変便利であることがわかった。ヘルペス感染細胞における特徴の 1 つともいえる核内封入体をさらに明確に証明する試みとして、toluidine blue にフクシンを加えた染色液を使用している論文もあるが³⁾、著者らは、ヘルペスの診断には必ずしも封入体の存在が重要であるとは考えていない。

Tzanck 法と Giemsa 染色法との比較において、細胞病理学の立場からは標本を検討する点に問題はないが、Giemsa 染色の場合には標本の作製に通常 20 分余を要する。著者らは Giemsa 液で 60 秒間、加温染色を行っているが、操作上の簡便さで Tzanck 法に利点がある。その他、2 倍希釈の Giemsa 液で 30~40 秒染色するもの¹¹⁾、Giemsa 液そのままでも同様に 30~40 秒染色するもの⁹⁾、methylene blue や Wright 染色を行ったり、cover slipping の有無について検討している報告もある^{6,11)}。

ヘルペス感染細胞に関して、典型的な形態変化が得られるのは発疹の時期によってかなり差があり、Veinen ら⁸⁾、Lynch ら¹¹⁾によると水疱の時期には 50~60%、膿疱では 54%、痂皮形成では 16% であるという。時期を問わずに平均してみると、Moseley らは 37.6~47.9% と報告している²⁾。著者らの症例はそのほとんどが水疱~

びらの時期に検体が採取されているので 63.4% となり、諸家のデータに比してやや効率が良くなっていると思われる。

Solomon ら⁵⁾は 30 人の皮膚科領域におけるヘルペス感染巣から 53.1% の Tzanck 法陽性所見を認め、78.1% にウイルス検出の成功を示している。

著者らのデータ (表 5) では、ヘルペス感染細胞の存否について Pap 法と Tzanck 法は完全なる一致をみた。したがって、いずれかの方法で特徴ある所見が証明できれば診断は簡単であるといえるが、細胞病理所見の得られないもの、すなわち細胞診陰性例が 11 名 (36.6%) に出現している。このうち血清抗体価の上昇を示した 4 例を除く 7 例 (23.3%) は、既往歴・臨床経過・臨床所見からみて典型的なヘルペスと考えられたが、この診断には“あいまいさ”が残っている。臨床的にヘルペスを疑われても抗体価測定や細胞診検査に一致しないという事実は、検査の時期・方法・判定・精度に問題があるのかもしれない。あるいは、珍しいことではあるが、外陰や陰に発症した帯状疱疹、水痘、天疱瘡または spongiotic vesicular dermatitis であったか、またはヘルペスであっても従来の 1 型や 2 型以外の亜分類の必要性を示唆しているのかもしれない。Veinen ら⁸⁾は、臨床ヘルペスと診断した 32 患者のうち 7 例 (21.9%) は蛍光抗体法、ウイルスの分離、細胞診がすべて陰性であったという。Solomon ら⁵⁾も 30 名の患者から得た 32 検体のうち 6 検体 (16.6%) がウイルスの分離、細胞診がともに陰性であった。その理由として、2 論文とも検体採取の時期に原因があると推定している。

産婦人科領域におけるヘルペス感染症は、単に急性感染のみならず再発感染、妊産婦においては流早産や催奇形性の可能性、産道感染による予後不良な新生児ヘルペスの原因にもなるため、その正しい診断は特に重要である^{7,9,10)}。ことに迅速で的確な診断と処置の要求される急性感染症、産婦に合併した陰や外陰のヘルペスには Tzanck 法が有用である。

V. 結 語

東京女子医科大学病院産婦人科および母子総合医療センター外来を受診した患者のうち、外陰ヘルペスの罹患率は 0.14~0.68% (1981 年 1 月~1985 年 7 月) であった。臨床的にヘルペス感染の疑わしい患者 30 名から採取した捺印または擦過細胞診標本に toluidine blue 染色を施して Tzanck smear を作製し、Pap 染色や Giemsa 染色標本と比較・検討した。その結果ヘルペス

感染細胞が19例(63.3%)に認められ, Tzanck smearとPap smearは全例に一致を示した。検体採取から鏡検まで操作は簡単で, 2分以内に終了し, 信頼できる結果を得られることからTzanck法は日常の診療にきわめて有用であることが判明した。

ヘルペスウイルスに対する血清抗体価の上昇を示したものは20例(66.7%)であった。抗体価と細胞病理学の所見から positive correlation は16例(53.4%), negative correlation は7例(23.3%)であった。

臨床的に典型的なヘルペス感染であっても, 抗体価測定や細胞診検査に反応しないものが7例(23.3%)あった。この7例の診断にはいささかの“あいまいさ”が残っており, 検体採取の時期, 方法, 精度などについて再検討の必要がある。

本論文の要旨は第26回日本臨床細胞学会総会(昭和60年6月, 東京都)において発表した。

本稿を終了するにあたり, ご指導, ご校閲いただきました東京女子医科大学産婦人科・武田佳彦主任教授, および米国オハイオ州シンシナティ大学医学部病理学教室・益川照夫副教授に感謝いたします。

Summary

We examined the effectiveness of the Tzanck preparation compared with routine Pap smears and serology complement fixation tests for herpes simplex in 30 herpetic patients. Twenty patients (66.7%) showed positive rise in serology complement fixation tests even though the clinical history and lesion of morphological findings were typical in all situations. Nineteen patients (63.4%) of the Tzanck smears and Pap smears were positive. Multinucleated giant cells that demonstrated nuclei with homogeneously stained “grey degeneration” or “ground-glass” chromatin pattern were required for a preparation to be called positive. These preparations had a high correlation with positive rise of serology complement fixation test. The Tzanck smear takes us only

two minutes to be performed.

Our study suggests that a positive Tzanck preparation is helpful, accurate, quick, easy and economical device for the early diagnosis of herpes genitalis, especially for acute inflammatory condition of the vulva, or pregnant women of near term.

文 献

- 1) Lynch, P.J., Welsh, O., Naylor, B.: Cytodiagnosis of vesicular viral lesions, *Cutis*, 6: 79~84, 1970.
- 2) Moseley, R.C., Corey, L., Benjamin, D., et al.: Comparison of Viral Isolation, Direct Immunofluorescence, and Indirect Immunoperoxidase Techniques for Detection of Genital Herpes Simplex Virus Infection, *J. Clin. Microbiol.*, 13: 913~918, 1981.
- 3) Pariser, R.J.: Diagnosis of spongiotic vesicular dermatitis by Tzanck smear, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 8: 518~522, 1983.
- 4) Rees, B.R.: The Tzanck test; A Historical Vignette, *Int. J. Dermatol.*, 7: 600~601, 1978.
- 5) Solomon, A.R., Rasmussen, J.E., Varani, J., et al.: The Tzanck smear in the Diagnosis of Cutaneous Herpes Simplex, *JAMA*, 251: 633~635, 1984.
- 6) Spiller, W.F., Spiller, R.F.: Giemsa stain for Tzanck smear, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 9: 464, 1983.
- 7) 鈴木忠雄: Herpes II Virus, 産と婦, 47: 1455~1458, 1976.
- 8) Veinen, N.K., Vestergaard, B.F.: Rapid diagnostic test for cutaneous eruptions of herpes simplex, *Acta Derm. Venereol.*, 58: 83~85, 1978.
- 9) 和田順子, 河西 洋, 篠崎百合子・他: 興味あるヘルペス感染症の3例, *日臨細胞誌*, 22: 823~827, 1983.
- 10) 和田順子, 木村祐子: ヘルペスウイルス感染細胞における経時的・形態学的観察, *日臨細胞誌*, 24: 51~56, 1985.
- 11) Wheeland, R., Burgdorf, W.H.C., Hoshaw, R.A.: A quick Tzanck smear, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 8: 258~259, 1983.