原 著

喀痰集細胞法（郵送-Dithiothreitol 法）の開発

大阪府医師会臨床検査センター細胞診断科¹⁾, 大阪府立成人病センター内科²⁾矢羽田一信¹⁾ 伏見 恵¹⁾ 川井 一男¹⁾赤土 洋三¹⁾ 宝来 威²⁾

粘液融解剤 Dithiothreitol (DTT) を用いた喀痰保存液 (0.005% DTT, 35% エタノールなどを含む) を開発調整した (DTT 液). また, 沈渣が取りやすく, 郵便ポストに投函可能な粘液粉碎翼付喀痰容器を開発した. DTT 液とこの容器を用いた喀痰集細胞法 (DTT 集細胞法) では喀痰中の粘液の融解率は 72 時間で 96% であった. 本法で作成した細胞診標本は粘液が融解されているので, 背景には粘液片はなく, 細胞は標本上に均等に分布したが, 細胞集団の保存性は良かった. 癌細胞の細胞質・核の染色性も良好で従来の肺癌細胞の判定基準に従って細胞型の判定も可能であった. 同一喀痰を用いた DTT 集細胞法と直接塗抹法の陽性率の比較では, 肺癌症例の喀痰 100 件での癌細胞検出率は DTT 集細胞法は 65%, 直接塗抹法 43% で, DTT 集細胞法が 22% 高率であった. また細胞型別では, DTT 集細胞法では扁平上皮癌 68%, 腺癌 61% で直接塗抹法の扁平上皮癌 48%, 腺癌 34% を大きく上回った. DTT 集細胞法は標本作成操作が簡易で同時に多数の検体の処理ができるので, 集団検診をはじめ増加する喀痰細胞診に有用な方法である.

Key words : Lung cancer—Sputum cytology—Cell concentration—Dithiothreitol

I. 緒 言

集細胞法による喀痰細胞診は喀痰中の細胞成分をできるだけ多く集め癌細胞検出率を向上せしめようというものである. また, 液状検体として取り扱うことから喀痰の保存が可能である. すでに集細胞法としては, 物理的に喀痰粘液を粉碎する Saccomanno 法^{3,5)}, 化学的に喀痰粘液を融解する蛋白分解酵素法^{4,7)}, アセチルシステイン法^{1,2)}などが報告されている.

The cell concentration method using Dithiothreitol for sputum cytology

Kazunobu YAHATA, C.T., I.A.C., Megumu FUSHIMI, C.T., M.I.A.C., Kazuo KAWAI, M.D., M.I.A.C., Yozo SHAKUDO, M.D.

Osaka Medical Association Clinical Laboratory Center

Takeshi HORAI, M.D.

Department of Internal Medicine, The Center for Adult Diseases, Osaka

論文別刷請求先 ☎543 大阪市天王寺区清水谷町 19 の 17 大阪府医師会臨床検査センター細胞診 矢羽田一信

昭和 61 年 8 月 28 日受付

昭和 62 年 1 月 16 日受理

著者らは粘液融解性の強い Dithiothreitol (以下 DTT と略す) を用いた喀痰保存液 (以下 DTT 液) を開発した. DTT 液で喀痰を保存すると, 1~3 日で粘液が融解され, 遠沈のみにより細胞成分を回収できるので標本作成過程が簡易となった. そして, 同時に開発した喀痰容器を用いることにより, 一度に多検体の処理が可能となり, しかも検体間の混入の危険性がなくなった. また DTT 液と本容器を用いた集細胞法 (以下 DTT 集細胞法) の染色標本は, 細胞の保存性が良く細胞質, 核などの染色性も良好であった.

本稿では, その方法を述べ, DTT 集細胞法によって得られた細胞所見, および癌細胞検出率について報告する.

II. 方 法

1. 喀痰保存液および容器の開発

DTT {DL-threo-1,4 dimercapto-2,3 butandiol または threo-2,3 dihydroxy-1,4 dithiolbutan ($C_4H_{10}O_2S_2$)} は, 蛋白質のジスルフィド (S-S) の結合の還元剤である SH 化合物で, 粘液に対する作用機序は図 1 のごとく

図1 DTTの粘液に対する作用機序

写真1 喀痰容器

DTT分子の両端の2個のSH基がムコタンパクのジスルフィド(S-S)基に反応し、これを開裂させるので急速に粘液の粘稠度が低下する。このDTTの粘液融解作用を応用し、喀痰回収中に粘液を融解させるための喀痰保存液(DTT液)の調整を行った。

DTT液の調整にあたっては、第一に細胞の保存性、染色性を考慮し、第二に粘液の融解性、第三に保存液の安定性を考慮した。エタノール濃度を0~95%まで5%段階で濃度を変え、またDTT濃度も0.001~0.1%まで変え、それぞれについて細胞の保存性、粘液の融解性について検討した結果、35%エタノール・2%ポリエチレングリコールに0.005%の割合でDTTを加えたものが最も上記の条件を満足したので、さらに0.0075%の抗結核剤Rifampicin(以後RFPと略す)を加えたものをDTT液とした。

DTT液を用い、喀痰回収から塗抹標本作成までを同一容器で行える喀痰容器を開発した。攪拌力向上のための粘液粉砕翼を付け、沈渣が取りやすく、かつ郵送による喀痰回収を行うため郵便ポストに投函可能な、最外径3cm、高さ12cm、全容量約40mlの円筒型の容器である(写真1)。

DTT液とこの容器を用いた集団検診における標本作成法は次のごとくである。

① DTT液20ml入りの喀痰容器に3日間蓄痰させ、採痰ごとに、よく混和させる。このとき痰量は最高10mlまでとする。蓄痰した容器は郵送により回収した。

② 回収した検体は64検体用の容器立てに立て、旋回振盪式の攪拌機(今回使用した機種は大洋科学工業のバイアルミキサー、VIX-100)で喀痰容器のまま64検体同時に2,000rpmで3分間攪拌した。検体数が少ないときは、サーモミキサーなどで攪拌しても良い。

③ 攪拌後、1,500rpmで3~5分間遠心分離し、上清を少量残しぎみにして捨て、沈渣をすり合わせ法にて塗抹し、ドライヤーなどで10~20分間乾燥後、パパニコロウ染色をした。本法では上清を捨てるとき初めて蓋をあけるため、検体間の混入の危険性がない。

2. DTT液による喀痰粘液の融解性の検討

外来患者50名の喀出痰を用いて、DTT液の調整後の保存期間と喀痰の融解に要する時間についての検討を行った。このとき、粘液が完全に融解され上清と細胞成分が分離したものを融解されたものとし、一部にでも不溶な部分を認めたものは不溶とした。

個々の痰を駒込ピペットを用いて約2mlずつ4等分したものに、調整直後のDTT液、調整後3, 6, および12ヵ月間室温で保存した4種類のDTT液6mlを入れ振盪混和した。そして、経時的にそれぞれについて24, 48, 72時間後に喀痰粘液が融解しているか否かについて検討した。

3. DTT液での細胞所見と肺癌陽性率の検討

肺癌症例50例100件の喀痰を用いて、直接塗抹標本を2枚作り、残りの喀痰をDTT液にて3日間保存し粘液を融解したのち、すり合わせ塗抹標本を2枚作成し、両者の細胞所見、肺癌細胞検出率を比較検討した。

そして、DTT液にて粘液融解処理をし標本を作成した残りの喀痰に再度DTT液を入れ、室温でDTT液中に1週間、1, 3, 12ヵ月間放置し、作成した標本の染色性および細胞所見について検討した。

また56°Cの恒温槽に24時間放置し、温度による細胞所見の変化についても同時に検討した。

また別の肺癌症例50例の喀痰を50%エタノールに3日間蓄痰し、その喀痰を2等分し、一方をSaccomannoのブレンダーで処理し、一方をDTT集細胞法を行い、両者の癌細胞検出率についても検討した。

表 1 DTT 液調整後の期間と喀痰粘液の融解率

	24 時間	48 時間	72 時間
調製直後	30 (60.0 %)	41 (82.0 %)	48 (96.0 %)
3 ヶ月後	31 (62.0 %)	40 (80.0 %)	47 (94.0 %)
6 ヶ月後	30 (60.0 %)	40 (80.0 %)	47 (94.0 %)
12 ヶ月後	28 (56.0 %)	39 (78.0 %)	46 (92.0 %)

写真 2 細胞の分散 (×100)

写真 3 扁平上皮化生細胞 (×400)

III. 結 果

1. DTT 液による喀痰粘液の融解性の検討

DTT 液の安定性をみるために DTT 液調整後の保存期間と粘液の融解率について検討した (表 1). 調整直後のもの, 調整後 3, 6, 12 ヶ月のいずれの DTT 液も喀痰と混入後, 時間の経過とともに粘液の融解率は向上し 72 時間後には, 92% 以上の融解率を示した. また難溶性であった検体も, 遠沈後上清を捨て新しい液を入れ, 攪拌することによりすべて融解させることができた.

DTT 液に加えた抗結核剤 RFP の効力について検討した. ヒト型結核菌 SGA 株, IKE 株, KAS 株を用い, それぞれ 10^3 個/ml の培養菌 1 ml と非結核患者の痰 5

写真 4 扁平上皮化生細胞 (×400)

写真 5 扁平上皮癌細胞 (×400)

ml に喀痰保存液 20 ml を加え, 室温で 3 日間放置後遠沈し, その沈渣を小川培地で 8 週間培養したが, 培養結果はすべて陰性であった.

2. DTT 集細胞法における肺癌細胞の所見

(a) 背景と分散

DTT 集細胞法では粘液が完全に融解されるため, 標本上には粘液片がなく, 細胞の分散性は良好で, 細胞は標本上に一層で均等に分布した (写真 2). 扁平上皮細胞, 円柱上皮細胞, 杯細胞, その他の非癌細胞は, 細胞質の保存性がよく, おおのこの細胞の特徴が良く保存された. 扁平上皮化生細胞は単個あるいはシート状の集団として出現し, 細胞質はライトグリーンあるいはオレンジ G に染色され, クロマチンパターンも明瞭に観察された (写真 3, 4).

(b) 扁平上皮癌細胞

扁平上皮癌細胞は, 孤立散在性または小集団で出現することが多く (写真 5), 細胞質の染色性は, オレンジ G, または, ライトグリーンに好染し, 核は不整形で N/C は大きく, 増量したクロマチンが観察された (写真 6).

また細胞壊死物質も小集塊として認められた.

写真6 扁平上皮癌細胞 (×1,000)

写真9 小細胞癌細胞 (×200)

写真7 腺癌細胞 (×400)

写真10 小細胞癌細胞 (×1,000)

写真8 腺癌細胞 (×1,000)

写真11 小細胞癌細胞 (×1,000)

(c) 腺癌細胞

腺癌細胞は、重積性を示す細胞集塊あるいは単個で出現し、ときに腺様配列も認めた(写真7)。細胞質はライトグリーンで染色され、泡沫状時には重厚に染まった。核縁は薄く、核形は不整形で、クロマチンは細顆粒状で不均等に分布した(写真8)。DTT集細胞法では、直接塗抹法に比し核小体は著明であった。

(d) 小細胞癌細胞

小細胞癌細胞は、DTT集細胞法では結合疎な集団または球状集塊として出現した(写真9)。細胞は互いに押

し合うようにして位置し、核の大小不同、核形不整がみられ、クロマチンは濃染状のものあるいは細顆粒状のものがみられ、核縁は薄く、核小体は小さく数個認められた(写真10)。DTT集細胞法では、細胞質は直接塗抹法に比し保存される傾向にあった(写真11)。

また、DTT集細胞法を行い標本を作成した残りの喀痰を再度DTT液で保存し、1週間、1, 3, 12ヵ月間室温で放置したのち作成した標本では、12ヵ月間放置後の腺癌細胞の細胞質に空胞化が目立ってきた点を除けば大きな変化は認められず、細胞の保存状態は良好であった。

56°C に 24 時間放置した検体についても細胞の染色性には変化は認められなかった。

本法により処理した喀痰標本に PAS 染色, アルシアン青染色, CEA (酵素抗体法) 染色を行った結果, PAS 染色により腺癌, 杯細胞の粘液, 扁平上皮細胞のグリコーゲンが陽性になり, アルシアン青染色により腺癌, 杯細胞の粘液が陽性となった。また CEA 染色を転移性腺癌について行った結果陽性を示し, これらの特殊染色も可能であった。

3. DTT 集細胞法での肺癌細胞の検出率

肺癌症例 50 例より得られた 100 件の喀痰を用いて DTT 集細胞法と直接塗抹法での癌細胞検出率を比較した。DTT 集細胞法の癌細胞検出率は 65.0% で, 直接塗抹法 43.0% に比べ, 22.0% 高率であった。細胞型別では扁平上皮癌 67.5%, 腺癌 61.4% で, 直接塗抹法の扁平上皮癌 47.5%, 腺癌 34.1% を大きく上回った (表 2)。

また, 肺癌症例 50 例の喀痰を用い, DTT 集細胞法とサコマノ法での癌細胞検出率の比較では, いずれの方法も陽性率 70% であり差は認められなかった。

IV. 考 察

近年, 肺癌の急増の対策として, 早期発見のために喀痰細胞診が肺癌検診にも取り入れられるようになった。集団検診では, 喀出新鮮痰による検査は種々の点から不適当であり, 蓄痰法を用いて行う必要がある。現在, Saccomanno 法が広く行われているが, さらに大きな集団を扱うようになれば, より簡便な方法が必要となる。

DTT 集細胞法は粘液融解性の強い DTT を用いているので, 攪拌のみで短期間で粘液が融解される。粘液融解後は上清を捨て, 沈渣を塗抹するのみで標本を作成できるので, 標本作成過程は非常に簡易となった。Saccomanno 法^{4,8)}では器具の取り扱いなど操作が複雑な点があり, 同時に多検体の処理には問題となろう。その点, DTT 集細胞法では一度に多検体の処理ができ, 塗抹まで同一の容器を用いて行うので, 検体間の混入の危険性がなくなった。粘液融解剤アセチルシステインを用いた方法^{2,9)}ではアセチルシステインの濃度が高い場合には細胞の染色性に変化がみられることがあり, また低濃度のアセチルシステイン⁶⁾では粘液の融解に時間がかかる。一方, DTT 集細胞法は約 72 時間で 90% 以上の検体で粘液が融解され, 難溶性を示した検体も DTT 液を入れ替えることにより粘液融解が可能で, 短期間で標本作成ができる。また同時に開発した粘液粉碎翼付の喀痰容器は郵便ポストに投函可能で, 郵送による検体の回収を可

表 2 DTT 集細胞法と直接塗抹法との喀痰細胞診成績の比較

細胞型	DTT 集細胞法 陽 性 例	直接塗抹法 陽 性 例	検体数
扁平上皮癌	27 (67.5%)	19 (47.5%)	40
腺 癌	27 (61.4%)	15 (34.1%)	44
小細胞癌	7 (70.0%)	6 (60.0%)	10
その他の癌	4 (66.7%)	3 (50.0%)	6
全 肺 癌	65 (65.0%)	43 (43.0%)	100

() 内は陽性率

能にした。郵送による喀痰の回収は, 回収率の向上にもつながると同時に検体回収時にすでに粘液が融解されているのでただちに標本作成に移ることができた。

DTT 集細胞法による標本では, 背景に粘液片はなく細胞は重層することなく均等に分布するため, スクリーニングが容易であった。細胞の保存状態は良く, 癌細胞, 非癌細胞の細胞所見は直接塗抹法に類似し, また, 標本中の癌細胞の出現数も多く, かつ癌細胞は細胞集団として出現する傾向にあるのでスクリーニングに際して発見されやすいと思われる。扁平上皮癌細胞は小集団あるいは単個で出現し, 細胞質の染色性は良く, とくに細胞壊死物質も小集塊として認められた。腺癌細胞は, 重積性または腺様配列を示す細胞集団として出現し, 細胞質は泡沫状を呈した。小細胞癌細胞は結合疎な集団または, 球状集団として出現し, 核クロマチンは細顆粒状を呈した。したがって, 細胞型の判定にあたっては従来の癌細胞判定基準により判定可能であると考える。

また DTT 液のエタノールの濃度の検討を行ったところ, 25% 以下では細胞の膨化, 染色性の低下が著明であり, 55~65% では, 細胞の収縮と細胞全体の濃染傾向が著しく細胞型の判定困難をきたす場合もあった。また 70% 以上のエタノールでは, 喀痰が凝固し融解不能となった。30~50% においては細胞の保存性, 染色性とも良好であったが, 30% エタノールでは, 1 ヶ月間放置後, 核の染色性の低下と一部にクロマチンの無構造化が認められた。また 50% エタノールでは, 粘液融解性の軽度低下がみられた。以上のごとく 35~45% エタノールを使用することによって, 粘液の融解性が向上するとともに核の濃染傾向, 細胞質の重厚化が軽減され細胞の微細構造を保存することができた。さらに PAS 染色, アルシアン青染色, CEA (酵素抗体法) 染色などの特殊染色が陽性を示すことから DTT 液は細胞内物質には影響を与えず機能的な面も保存できると考える。

DTT 液中に喀痰を 1 年間室温で放置し細胞形態の観察を行ったが, 3 ヶ月までは特に変化はなかった。1 年後

でも、腺癌細胞の細胞質に空胞化が目立ってきた点を除けば大きな変化は認められず保存状態は良好であった。また DTT 液を調整後1年間室温で保存したものでも粘液の融解率は92%で、長期にわたって使用可能であった。

肺癌症例50例の喀痰を2等分し、一方を Saccomanno 法、一方を DTT 集細胞法を行い、両者の肺癌細胞検出率を比較検討したが、いずれの方法も陽性率70%であり差は認められなかった。

肺癌症例の直接塗抹標本を作成した残余の喀痰で DTT 集細胞法を行い癌細胞の検出率の比較をしたところ、DTT 集細胞法が22%高率であった。特に腺癌での陽性率の向上が著しかった。これはアセチルシステイン集細胞法^{2,8)}、Saccomanno 法³⁾などでも報告されたと同様の成績で、集細胞法の効果と考えられる。直接塗抹法では、喀痰の一部しか塗抹されないため、標本中に癌細胞が出現しないこと、あるいは癌細胞の出現が小数のため診断が困難な場合がある。それに比べ集細胞法では、全喀痰からできるだけ多くの細胞を集めてくることにより癌細胞が十分検出し得たのであろう⁶⁾。また標本作成に当たっては直接塗抹法では、ある程度の熟練が必要であり個人差が生ずることも陽性率に影響すると考えられるが、DTT 集細胞法では沈渣を塗抹するだけなので誰もが均一な標本を作成することができると考える。

DTT 集細胞法は、標本作成が簡便で、多数の検体を同時に処理でき、また郵送が可能な点から、増加の傾向にある喀痰細胞診において有用な方法であると考ええる。

Summary

A new technique for collecting cells from sputum using Dithiothreitol (DTT) and a container of sputum specimen were developed. The container is convenient for posting in size and has webs for solving mucus. In the sputum smear

sample by this method, mucus is completely dissolved and cells are distributed uniformly on the slide and cell clusters maintain their feature well. The stainability of cytoplasm and nucleus of cancer cells was almost the same as that of the direct smear method. The rate of positive cytologic diagnosis of the samples from pulmonary carcinoma patients was 65% by this method, 22% higher than that by direct smear method using the same sputum. The procedure of this method is simple, requiring only centrifugation but no other special apparatus. As many specimens can be handled at once, it is useful for preparing sputum specimens in mass survey.

文 献

- 1) Bonime, R.G. : Improved procedure for the preparation of pulmonary cytology smears, *Acta Cytol.*, 16 : 543~545, 1972.
- 2) Horai, T. and Ueki, A. : The cell concentration Method Using Acetylcysteine for Sputum Cytology, *Acta Cytol.*, 22 : 580~583, 1978.
- 3) 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 : 195~204, 1977.
- 4) Pharr, S.L. and Faber, S.M. : Cellular concentration of sputum and bronchial aspiration by tryptic digestion, *Acta Cytol.*, 16 : 447~454, 1962.
- 5) Saccomanno, G., Sanders, R.P., Ellis, H., et al. : Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum, *Acta Cytol.*, 7 : 305~310, 1963.
- 6) 佐藤博俊, 斉藤泰紀, 橋本邦久 : 早期肺癌カラーアトラス, 金原出版, 東京, 1985.
- 7) Takahashi, M. and Uebe, M. : A new cell concentration method for cancer cytology of sputum, *Cancer*, 16 : 199~204, 1973.
- 8) 植木明美, 宝来 威 : アセチルシステインによる喀痰集細胞法, *日臨細胞誌*, 16 : 61~65, 1977.