総説

肺癌検診における喀痰標本の作製

大阪府立成人病センター内科

松田 実

喀痰細胞診を肺癌集検の場で行うには、1) 細胞の保存が良好であること、2) 標本の作製が簡単であること、3) 標本が美麗で異型細胞のスクリーニングが容易であること、4) 陽性率が高いこと、5) 経済的であること、6) 安全性が高いこと、などが必要な条件となる。現在までに、喀痰保存の目的で、ホルマリン固定法、名市大法、サコモノ法などが行われ、細胞診陽性率を高める目的で、蛋白分解酵素あるいは粘液融解剤を用いる集細胞法が行われてきた。最近では、サコモノ氏固定液に粘液融解剤を加える方法が行われ、操作が簡単で、背景がきれいであるために、異型細胞のスクリーニングが容易であるといわれている。標本作製法の歴史を知るとは興味のある事実であり、また啓発される点も多い。

Key words: Lung cancer—Sputum cytology—Preparatory techniques—Mass screening—Review

I. はじめに

第28回日本臨床細胞学会総会において、教育シンポジウムとして、「肺癌検診における喀痰標本作製」がとりあげられ、わたくしと池田が座長をつとめさせていただいた。この機会に、喀痰標本作製法の歴史をふり返り、現在行われている方法に至るまでの過程を知るとは、将来への参考にもなりうると考え、喀痰標本作製法に関する論文をもう一度読み直し、それをわたくしなりにまとめた。

II. 肺癌の集検において喀痰標本作製に必要な条件

現在最も普及している喀痰細胞診の方法は、直接塗抹

Preparatory techniques of sputum specimens in the mass screening for detection of lung cancer

Minoru MATSUDA, M.D., F.I.A.C.

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

論文別刷請求先 ☎537 大阪市東成区中道1の3の3 大阪府立成人病センター内科 松田 実

昭和62年7月16日受付

昭和62年10月16日受理

法を3回行う方法であるが、これを集検の場において行うと、多大の人手と費用を必要とし、実際には不可能である。集検のように、一定の費用のもとで、一度に多数の検体を取り扱う場合には、次のような条件が必要である。

1. 喀痰の保存が良好であること。

高橋³³⁾は、喀痰を30°Cの室温に放置した場合、5時間経過すれば肉眼的に軟化傾向を示し、24時間経過すれば著しく張力を失い、粘稠性も減ずるが、肉眼的変化に一致して細胞変性が起こり、24時間放置後標本作製した場合、変性した少数の扁平上皮細胞が認められるのみであると報告している。

2. 標本の作製が簡単であること。

3. 標本が美麗で異型細胞のスクリーニングが容易であること。

標本が汚いとスクリーニングに時間がかかり、細胞変性が強いと誤判定の原因となる。

4. 陽性率が高いこと。

固定時、細胞成分がスライドガラス面から分離しやすいと、当然陽性率の低下が予想される。またなるべく癌細胞を集めることができれば最も効果的である。

5. 経済的であること。

6. 安定性が高いこと。

サコマノ氏液を誤飲された経験がある。

III. ホルマリンによる喀痰の保存

細胞保存液に関する最初の報告は、1961年の高橋と浦部の報告³²⁾である。彼らは、NaCl 0.85 g, KCl 0.02 g, CaCl₂ 0.02 g, NaHCO₃ 0.2 g を水 98.0 cc に溶解した液（リングル液にほぼ類似、1965年にはリングル液でもよいと記載³⁵⁾）と、ホルマリン 2.0 cc の混合液が、細胞保存に役立つことを報告し、保存液 約 10 cc 中に喀痰を喀出させることにより、細胞の保存が可能であることを発表した。1963年、彼らの論文は、Cancer³⁴⁾にも掲載され、保存液を使用した喀痰は、24時間後も細胞構造が保たれていると報告されている。

1974年、米田と栗原⁴⁰⁾は、0.5%ホルマリン加リングル液を、ポリエチレン製の袋に入れ、アルミニウムで作った薄い外箱におさめ、喀痰郵送法による細胞診を開発した。この方法はポストチューブ法と呼ばれ、喀痰を郵送しうる唯一の方法としてわが国で普及した。彼らによれば、喀痰の保存は少なくとも5日間は可能であるという。

1979年、早田と加藤⁷⁾は、アルミニウム製で、大きさが9.5×6.0×1.6 cmの、東京医大式喀痰細胞診用蓄痰容器を作製し、そのなかに1%ホルマリン液の入ったポリエチレン製の袋を入れ、3～5日間の蓄痰と、郵送の可能な方法を報告している。

ホルマリンは、保存液としては低濃度の方がよく、0.5～1.0%液が用いられているが、細胞保存性にすぐれているものの、塗抹固定時、細胞がスライドガラス面から剝離しやすく、パパニコロウ染色を行った場合は、核の染色性が劣る¹⁷⁾。

IV. 名市大法

1980年、柴田と小林²⁸⁾は、喀痰保存液として、0.5～1.0%ホルマリン生食水、50%または30%エタノール生食水、0.5%ホルマリンに、40～45%イソプロパノール生食水、35～40%エタノール生食水、あるいは45～50%メタノール生食水をそれぞれ加えた液、0.5～1.0%チモールに、35～40%イソプロパノール生食水、35～40%エタノール生食水、あるいは45～50%メタノール生食水をそれぞれ加えた液について、喀痰塗抹の難易、喀痰のスライドガラス面からの剝離、細胞質および核の染色性、スクリーニングの難易、細胞の保存性について検討した結果、0.5～1.0%チモール・45～50%メタノール生食水が最もすぐれていたと報告し、1985年には、1%

チモール・50%メタノール生食水を名市大液として記載¹⁷⁾している。

アルコール系固定液の最適濃度として、イソプロパノールは40%、エタノールは35～40%、メタノールは45～50%といわれている²⁹⁾。メタノールは、イソプロパノールやエタノールに比べて、喀痰の収縮力が最も弱く、塗抹のしやすさですぐれており、チモールは、喀痰の蛋白成分の凝固と脱水作用があるので、喀痰粘液の水分を減少せしめ、スライドガラス面への固着を良好とする¹⁷⁾。

名市大液で保存された喀痰は、標本作製時、喀痰を全量シャーレに移し、耳鼻科用ピンセットで喀痰を広げ、肉眼でよく観察し、癌細胞のでやすい部位を3～5箇所選んで、ピンセットで少しずつピックアップし、すりあわせ法でフロストガラスに塗抹する。塗抹後は、99%イソプロパノール、または95%エタノール・5%ポリエチレングリコール液で1時間以上再固定する必要がある。

本法では、喀痰の採取部位の選択が必要である。標本の良否により癌細胞の検出率に差がみられるので、標本作製に慣れが必要であるといわれる¹⁷⁾。またどうしても、塗抹面の厚いところと薄いところができ、厚いところではスクリーニングがしにくい。

1982年、加藤ら¹²⁾は、1%ホルマリン液のかわりに、名市大液（1%チモール 1 ml, 50%メタノール 9 ml）を前記蓄痰容器に入れ、東京医大式蓄痰式ポストチューブと名付け、集検に用いているが、有効喀痰率は、1回式ポストチューブ法に比べて、2倍近く向上したと報告している。これとほぼ同様であるが、容器内のビニール袋が3つにわけられ、3日間別々に採痰するように作られた、東京医大式連痰法¹³⁾がある。最近、加藤は¹⁴⁾、メタノールの有害性を考慮し、50%メタノールのかわりに50%エタノールを用いている。

V. サコマノ法

サコマノ氏固定液にはポリエチレングリコール（カーボワックスは商品名）が使われているが、これを始めて細胞診標本の作製に用いたのは Sillis³⁰⁾であり、1953年のことである。彼は、細胞を良い状態で保存し、無染色のまま中央検査室へ標本を送るための簡単な方法が必要であることを痛感し、種々の研究の結果、次のような方法を発表した。すなわち、エーテル・アルコールで固定した標本を、あらかじめ融解したカーボワックス 1540に2～3分浸す。スライドガラスを引き上げると、ワックスは冷えて固くなりガラス面上をおおう。標本を水洗するとワックスの被膜は除去されるので、ただちにヘマト

キシリン液に入れ、引き続きパニコロウ染色を施行する。

さらに Sillis と Carret³¹⁾ は、ワックス 10 cc を 60°C に溶かし、95% エタノール・エーテル等量溶液 100 cc と混じる方法を発表している。1957年、彼らは、塗抹標本を 30~60 分間本固定液で固定後乾燥させ、染色前に水洗してワックスの被膜を除去し、ヘマトキシリン液に入れている。彼らは、本法を用いた場合、核構造は明瞭であり、細胞質は好酸性であるが診断に差支えないことから、喀痰標本に用いて十分満足すべき結果が得られたと報告している。また、エーテルアルコールとポリエチレングリコールの混合液は、密封した容器に入れておくと、蒸発することなく長期間使用できるので、経済的であると述べている。

1959年、Ehrenreich と Kerpe²⁾ は、95% エタノール・エーテル等量溶液に、56°C で溶解したポリエチレングリコールを 5% の割合で加え、本液を数滴スライドガラス面上に滴下し、30~60 分固定後乾燥させると、郵送可能な標本ができると報告している。

このように、喀痰標本の固定に、かなり古くからエタノールとカーボワックスの混合液が使用されてきたが、この液のなかに喀痰を保存させることをみいだしたのは Saccomanno である。1963年 Saccomanno²⁴⁾ は、2% の割合にカーボワックス 1540 を加えた、50% エタノール溶液（彼はエタノールの濃度は多少低くてもよいという）に喀痰を保存し、高速のブレンダーで 3~5 秒間攪拌することにより、喀痰中の粘液がブレンダー特有の装置とスピードによって切断され、細胞が均等に分散塗抹される方法を発表した。カーボワックスは、標本作製の過程で、標本を乾燥させた際、細胞の収縮を防ぐと述べられている。高橋³⁵⁾ は、1965年すでに本法を紹介しているが、本法がわが国で行われなかったのは、Saccomanno の論文を読んでも、実際にどのような装置を使ってどのように行うのかよくわからなかったからであろう。

1975年、わたくしは、日米癌協力研究事業の細胞診部門の一員として渡米する機会を得、Mayo Clinic を中心とする Early Lung Cancer Group では、サコマノ法を用いて標本が作製されていることを知り、Dr. Saccomanno を訪問した。翌年、国立がんセンター池田博士のご好意により、ワーリングブレンダーを入手することができたので、彼の方法を追試し、本法を用いて行った喀痰細胞診の成績を報告したが、直接塗抹法を 1 回 3 枚の標本で行うよりも陽性率は 18.0% 上昇した^{18, 21)}。1975年、Saccomanno が American Society of Cytology のワークショップで発表した標本作製法では、ヘマトキシリン

はリリーマイヤーのヘマトキシリンを用いているが、わたくしの経験では、ハリスのヘマトキシリンを用いてもなら差支えなかった。

本法により標本作製する場合、わたくしの経験では、厚く塗抹しないことおよび、ヘマトキシリンに過染させないことが重要である。

本法の長所は、単に喀痰の保存が可能であるというだけでなく、乾燥固定することにより、スライドガラス面上からの細胞の剝離も少ない。さらに、前述の注意を守って良好な標本作製すれば、粘液はきれ、細胞は標本面上に均等に分散されて、異型細胞の発見が容易となり、集細胞法の特徴として、細胞診の陽性率が上昇することである。

中尾ら^{19, 20)} は、簡易ブレンダーを作製して本法を行い、さらに Dremel 社製のモーターを応用し、この器械に適合するステンレス鋼製のスクリーシャフトを別途に作製し、攪拌効果を高める方法を発表している。

佐藤ら²⁵⁾ は、標本作製の全行程に一貫して使用可能な喀痰処理容器を作製し、ホモジナイザーの歯を自動的に洗浄できるように工夫し、抗研式変法と名付けた。本法は、喀痰処理容器が小さいので、喀痰量の多い場合に不安が残るが、喀痰処理容器をそのままホモジナイザーに装着できる点、ホモジナイザーの歯が自動的に洗浄できる点で、多数の検体を取扱う場合には便利であると思われる。

VI. 蛋白分解酵素を用いる集細胞法

喀痰中の癌細胞を集め、陽性率を高めようとする試みは、かなり古くから行われてきた。1953年、Farber ら³⁾ は、トリプシン 12.5 mg を 12.5 ml の Sorensen's buffer (pH 7.1) に溶解せしめ、8~10 cc の喀痰に加えて喀痰を溶解し、遠沈後沈渣に 0.5~1.0 ml の血清を加えて塗抹する方法を発表した。その後、キモトリプシン³⁷⁾、タカマイントリプシン²²⁾、ヒアルロニダーゼ¹⁵⁾ などをを用いる方法が報告された。

わが国では、1961年、高橋と浦部³²⁾ が、トリプシン 20 mg を前述の細胞保存液 10 cc に溶かし、濾過後喀痰に加え、駒込ピペットを用いて吸引を繰り返す方法を発表し、服部と松田⁶⁾ は、アルカリンプロテアーゼを用いる方法を報告した。

しかしこれらの方法を追試した結果、細胞のスライドガラスへの接着が悪く、酵素量が多いと細胞変性を起こし、操作が複雑なわりに陽性率を上昇せしめることができなかった。以上のことから、この方法は最近ではほと

んど行われていない。

VII. 粘液融解剤を用いる集細胞法

アセチルシステイン、ジチオスレイトールは、ともに結核菌培養のために喀痰を融解させる目的で用いられてきた。Hirsch ら⁸⁾によれば、喀痰融解作用があるのは Sulfhydryl 群であり、単独では 1.5% ジチオスレイトールが最も強力であり、次いで 20% アセチルシステインである。

1972 年、Bonime¹⁾ は、20% アセチルシステインを pH 7.0 に調整後、喀痰に加えると、20~40 分後融解するので、遠沈後沈渣を塗抹し、癌細胞を集める方法を発表した。植木と宝来³⁰⁾は、本法を追試した結果、標本作製中に細胞の脱落が激しく、標本面上の細胞が集団を作りやすいことを知り、一部改良して、アセチルシステイン集細胞法を実用化し、Acta Cytologica にも掲載⁹⁾された。この方法では、喀痰に約 2 倍量の 50% エタノールを加え、一昼夜固定するが、長期間の保存も可能である。しかし、アセチルシステインの pH の調整が必要であること、遠沈を 3 回繰り返さなければならないことなど、やや操作が繁雑で、細胞変性もやや強い傾向がみられる。

小林は¹⁶⁾、自動化細胞診のための喀痰標本作製法として、喀痰を 2% ポリエチレングリコール加 1% ホルマリン液に保存し、18,000 rpm 30 秒間攪拌し、1,500 rpm 5 分間遠沈し、沈渣を 20% アセチルシステインと 0.1% ブロメライン混合液に投入融解し、細胞浮遊液としてオートスマエにかけける方法を発表している。

Grainger と Husain⁴⁾ は、メチルシステインを 2% 生食水として、喀痰 5~10 cc に入れ、15 秒間手で振盪する方法を報告しているが、本溶液は 4°C に保存し、2~3 日ごとに作製する必要があることから、集検には適さないと思われる。

ジチオスレイトールを初めて細胞診に用いたのは Husain ら¹⁰⁾である。1974 年彼らは、婦人科材料の自動診断に適する標本作製する目的で、細胞分散を最大限にし、細胞形態の変化を最小限に保持するには、完全とはいえないがと前置きして、0.1% ジチオスレイトールを含む、1% 醋酸加 20% エタノール生食水に、材料を浮遊させる方法がよいと報告した。さらに 1978 年、KH₂PO₄ 6.8 g, NaOH (1 N) 29.60 ml, NaCl 29.2 g, ジチオスレイトール 1.0 g をエタノール 400 ml に水を加えて 1 l とした液 (pH 7.2±0.05) を Cellfix と呼び、少なくとも室温で 1 週間は細胞の保存が可能であると報告¹¹⁾した。彼らは、婦人科材料を Cellfix の入ったびん

に採取し、遠沈後ハンクス液に再浮遊させ、その 1 滴をポリリシンでコーティングしたスライドガラスに滴下し、塗抹乾燥させて標本作製しているが、喀痰材料についての報告はないようである。

VIII. サコマノ氏液に粘液融解剤を加える方法

サコマノ法では、ブレンダーに接続して喀痰を入れるコンテナを多数必要とする。このコンテナを必要とせず、標本作製をより簡単にする目的で、サコマノ氏液に粘液融解剤を加えて喀痰を保存し、遠沈のみで標本作製しようとする試みがなされている。この場合、サコマノ法で作製した標本面上にみられる粘液片は消失し、背景がきれいになるため、スクリーニングがさらに容易であるという利点がある。

佐藤ら²⁰⁾は、喀痰処理液 (メルティ・ブルー、35% エタノール、2% カーボワックス、0.05% アセチルシステインを含み、pH が中性になるよう調節した液) 20 ml に蓄痰せしめ、攪拌装置 (マルチブレンダー) を用いて、4,000 rpm 3 分間攪拌し、遠沈後沈渣を塗抹する方法を発表している。本法によると、低濃度のアセチルシステインによって、約 1 週間の間に喀痰中の粘液は融解し、攪拌によって粘液と細胞成分は分離し、遠沈によって細胞成分を選択的に集められる。

1985 年、Yamagishi ら³⁹⁾は、2% カーボワックス 1540, 0.5% polyoxyethylene-cetyl-ether, 0.05% 3, 5-ditert-butyl-4-hydroxy-toluene, および 0.03% 2, 3-dihydroxy-1, 4-dithiol-butane の混合液 (YM 液) を入れた容器に蓄痰せしめ、容器を約 10 秒間手で振盪し、1~12 時間静置し、沈渣を塗抹する方法を発表している。喀痰融解作用のあるのは、2, 3-dihydroxy-1, 4-dithiol-butane で、後述するジチオスレイトールとは、分子式は同じであるが構造式が異なる。この方法は、喀痰の保存性はよいが、粘液融解作用は、溶液作製後 2 週間以上たつと 41.7% に低下するといわれている。

翌年、橋本ら⁵⁾は、ジチオスレイトール (2, 3-dihydroxy-1, 4-dithiolbutane threo isomer) を用いる方法を発表している。すなわち、スプータゾル (Oxid 社、ジチオスレイトール 0.1 g, NaCl 0.78 g, KCl 0.02 g, NaHPO₄ 0.112 g, KH₂PO₄ 0.02 g, pH 7.4) 1 バイアルを 5 ml の蒸留水に完全に溶解せしめ、サコマノ氏液 2 l に添加し、最終的にジチオスレイトールの濃度が 0.005% の液を作製し、これに蓄痰せしめる方法を発表している。標本作製に際しては、遠沈後沈渣を塗抹し、95% エタノールで再固定する。本液は、1 年間以上安定した活

性を示すといわれている。

矢羽田³⁸⁾は、エタノール濃度を 35% とし、回収した喀痰を、旋回振盪式攪拌器で 2,000 rpm 3 分間攪拌後、遠沈し、沈渣を塗抹する方法を報告している。

本法では、エタノール濃度は低い方が喀痰は融解しやすいが、35% 以下になると、固定作用が低下し、染色性が悪くなる。したがって、すべて 35~50% のエタノールが用いられている。また、標本面上からの細胞の剝離を防ぐため、サコマンノ法と同様、乾燥固定が行われている。標本作製に際しては、検体を攪拌する必要がある、そのための装置を必要とする（山岸らの方法では不要）。本法を用いても喀痰の融解しない例が 5~10% みられ、これらの検体では、サコマンノ法を用いなければならない。

サコマンノ氏液にジチオスレノールを加えて蓄痰せしめる方法は、いまだ集検に用いられた報告がなく、今後、溶液の保存性、標本作製の簡便性、陽性率、標本の保存性、経済性などについて検討されねばならないであろう。

IX. おわりに

現在までに行われてきた、喀痰塗抹標本作製法について歴史的に述べてきた。1 つの方法が開発されるまでに、いろいろな研究が試みられ、漸次完成されていく過程を知することは非常に興味のある事実である。現在用いられている方法については、若干の解説と批判を試みたが、実際に用いるにあたっては、読者みずからが文献を読み、体得されることが必要である。

肺癌集検が老健法にとり入れられることになったので、ハイリスクに対する喀痰細胞診の必要性はふえるものと思われるが、どのような方法が適切かは、集検の規模、スクリーナーの数、予算など、集検実施機関の環境により決定されるとよいであろう。

Summary

The Utility of cytologic examination of sputum in the mass screening for the detection of lung cancer is as follows.

1) Cellular preservation is good. 2) Preparatory technique is simple and easy. 3) Over-all cytologic picture is clear and cytologic details are sharp and distinct. 4) Percentage of positive specimens is high. 5) Preparing technique is economical. 6) Preparing technique is extremely safe. Until now, as collecting and preserving methods of sputum, formalin-fixed methods, Meishidai's method and Saccomanno's

method have been used. To obtain high cytologically positive results in diagnosing carcinoma of the lung, cell concentration methods using proteolytic enzymes or mucolytic agents has been utilized. Recently, new fixative for collection of sputum has been developed, that is, mucolytic agent is added to Saccomanno's fixative. In this method, it is considered to be simple to make smears and easy to detect atypical cells on smears, because of the clean background, as compared to the ordinary Saccomanno's method. Reading the history of sputum collection and preparation has given us both fun as well as enlightenment. I hope that this text will facilitate and serve as a reference of cytologic examination at the employment in the mass screening for detection of lung cancer.

文 献

- 1) Bonime, R.G. : Improved procedure for the preparation of pulmonary cytologic smears, *Acta Cytol.*, 16 : 543~545, 1972.
- 2) Ehrenreich, T. and Kerpe, S. : New rapid method of obtaining dry, fixed cytological smears, *J.A.M.A.*, 170 : 1176~1177, 1954.
- 3) Farber, S.M., Pharr, S.L., Wood, D.A., et al. : The mucolytic and digestive action of trypsin in the preparation of sputum for cytologic study, *Science*, 117 : 687~690, 1953.
- 4) Grainger, J.M. and Husain, O.A.N. : Use of a mucolytic agent (Cytoclair) in the preparation of cell material for the detection of malignant cells in sputum, *J. Clin. Path.*, 31 : 585~590, 1978.
- 5) 橋本泰吉, 智片英治, 桑原 修・他 : Dithiothreitol による喀痰集細胞法の改良, *日臨細胞誌*, 25 : 479~484, 1986.
- 6) 服部正次, 松田 実 : 肺癌細胞の Concentration Method について, *日胸臨*, 22 : 828~834, 1963.
- 7) 早田義博, 加藤治文 : 呼吸器系の細胞診, *Medicina*, 16 : 1998~2001, 1979.
- 8) Hirsch, S.R., Zastrow, J.E. and Koy, R.C. : Sputum liquefying agents : A comparative *in vitro* evaluation, *J. Lab. and Clin. Med.*, 74 : 346~353, 1969.
- 9) Horai, T. and Ueki, A. : The cell concentration method using acetylcysteine for sputum cytology, *Acta Cytol.*, 22 : 580~583, 1978.
- 10) Husain, O.A.N., Allen, R.W.B., Hawkins, E.J., et al. : The quantimet cytoscreen and the interactive approach to cancer screening, *J. Histochem. and Cytochem.*, 22 : 678~684, 1974.
- 11) Husain, O.A.N., Page-Roberts, B.A. and Millet, J.A. : A sample preparation for automated cervical cancer

- screening, *Acta Cytol.*, 22 : 15~21, 1978.
- 12) 加藤治文, 岩橋 一, 早田義博・他: 早期中心型肺癌発見のための効率的なスクリーニング法の開発に関する研究, 大和ヘルス財団の助成による研究業績集, 第7集, pp. 11~24, 1982.
 - 13) 加藤治文, 小中千守, 斉藤雄二・他: 肺癌診断の現況, 日健診誌, 11 : 233~239, 1984.
 - 14) 加藤治文: 私信.
 - 15) Knudtson, K.P.: Mucolytic action of hyaluronidase of sputum for the cytological diagnosis of lung cancer, *Acta Cytol.*, 7 : 59~61, 1963.
 - 16) 小林康夫: 自動化細胞診のための喀痰塗抹標本作製法, 衛生検査, 29 : 831~835, 1980.
 - 17) 小林康夫, 近藤明人, 柴田偉雄: 保存痰の処理方法, 臨床病理, 特集 61号 : 43~50, 1985.
 - 18) 松田 実: Saccomanno 法による喀痰細胞診, 肺癌, 17 : 281~287, 1977.
 - 19) 中尾 清, 篠原利光, 西 国広・他: 簡易 Saccomanno 変法による喀痰細胞診, 日臨細胞誌, 17 : 317~321, 1978.
 - 20) 中尾 清, 西 国広, 園田文孝・他: 簡易 Saccomanno 法による喀痰細胞診(第2報), 日臨細胞誌, 20 : 240~246, 1981.
 - 21) 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.
 - 22) Pharr, S.L. and Farber, S.M.: Cellular concentration of sputum and bronchial aspirations, *Acta Cytol.*, 6 : 447~454, 1962.
 - 23) Risse, E.K.J., Van't Hof, M.A., Laurini, R.N., et al.: Sputum cytology by the Saccomanno method in diagnosing lung malignancy, *Diagnostic Cytopathology*, 1 : 286~291, 1985.
 - 24) Saccomanno, G., Saunders, R.P., Ellis, H., et al.: Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum, *Acta Cytol.*, 7 : 305~310, 1963.
 - 25) 佐藤博俊, 赤萩栄一, 斉藤泰紀・他: 新しい喀痰細胞診—サコマノ氏集細胞法の抗研式変法, 癌の臨床, 25 : 1461~1465, 1979.
 - 26) 佐藤博俊, 斉藤泰紀, 橋本邦文: 早期肺癌カラーアトラス, pp. 9~12, 金原出版, 東京, 1985.
 - 27) Shar, R.K. and Dye, W.E.: Use of dithiothreitol to replace N-acetyl-L-cysteine for routine sputum digestion-decontamination for the culture of mycobacteria, *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 94 : 454, 1966.
 - 28) 柴田偉雄, 小林康夫: 肺癌の細胞診, 現代医学, 27 : 345~350, 1980.
 - 29) 柴田偉雄: 肺癌検診と細胞診, 臨床検査 MOOK, No. 21 : 85~93, 1985.
 - 30) Sillis, B.: Dry method for conserving and transporting cytological smears, *J.A.M.A.*, 151 : 230, 1953.
 - 31) Sillis, B. and Carret, M.: Mailing of fixed and dried cytological smears, *J.A.M.A.*, 165 : 2219~2220, 1957.
 - 32) 高橋正宜, 浦部幹雄: 喀痰中の癌細胞診の1新法, 内科, 7 : 519~524, 1961.
 - 33) 高橋正宜: 肺癌診断のコツ, 細胞診, 癌の臨床, 9 : 116~121, 1963.
 - 34) Takahashi, M. and Urabe, M.: A new cell concentration method for cancer cytology of sputum, *Cancer*, 16 : 199~204, 1963.
 - 35) 高橋正宜: 癌の細胞診断, pp. 92~102, 医学書房, 大阪, 1965.
 - 36) 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.
 - 37) Umiker, W., Young, L. and Waite, B.: The use of chymotrypsin for the concentration of sputum in the cytologic diagnosis of lung cancer, *Univ. Michigan Med. Bull.*, 24 : 265~267, 1958.
 - 38) 矢羽田一信, 伏見 恵, 川井一男・他: 喀痰集細胞法(郵送 Dithiothreitol 法)の開発, 日臨細胞誌, 26 : 398~403, 1987.
 - 39) Yamagishi, K., Koketsu, H., Tajima, M., et al.: A new method of preparing specimens for cytodiagnosis of lung cancer, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 15 : 415~421, 1985.
 - 40) 米田良蔵, 栗原和夫: 喀痰郵送法による細胞診の確立について, 医療, 28 (増刊号第2分冊) : 475, 1974.