症 例

アスペルギルス症の1例

——真菌用蛍光染色液を用いた重染色の試み——

近畿大学医学部第2病理学教室¹⁾, 同 附属病院 病院病理部²⁾,近畿大学医学部第1病理学教室³⁾, 同 神経内科⁴⁾古田 朋子¹⁾ 木村 雅友¹⁾ 大塚 佳世¹⁾ 上杉 忠雄²⁾筑後 孝章³⁾ 八木 祐吏⁴⁾ 佐藤 隆夫¹⁾ 橋本 重夫¹⁾

副鼻腔アスペルギルス症が脳に進展した1剖検例の脳膿瘍細胞診について報告した。パパニコロー染色標本のスクリーニングでは発見しにくい真菌菌糸の検出を、ファンギフローラY[®]パパニコロー重染色で試みた。

症例は80歳、男性。右眼窩部から蝶形骨洞にかけてアスペルギルス感染を来し、抗真菌剤の投与を受けていたが功を奏さず、約7ヵ月後、MRIで側頭葉に脳膿瘍が確認され、全身状態が悪化し死亡した。剖検時に脳膿瘍部の膿汁を用いて塗抹標本作製し、真菌蛍光染色液ファンギフローラY[®]とパパニコロー染色の重染色を行った。対物10倍レンズを用い光学顕微鏡で行ったスクリーニングでは菌糸の発見は困難であったが、蛍光顕微鏡を用いると真菌菌糸は強い蛍光を発し、スクリーニングでもきわめて容易に発見できた。以上のことから細胞診での真菌菌糸の検出、観察にファンギフローラY[®]パパニコロー重染色はきわめて有用であると考えられた。

Key words : Brain—Smear cytology—Aspergillus—Fluorescent stain—Case report

I. はじめに

かつてはきわめてまれな疾患とされてきた深在性真菌症は近年、抗生剤や副腎皮質ステロイド、抗癌剤などの頻用に伴って増加傾向にある。細胞診で真菌を同定し得れば患者に少ない侵襲で真菌症の診断ができ、

A case of aspergillosis—Application of double staining with fluorescence dye for fungi—

Tomoko FURUTA¹⁾, M.D., Masatomo KIMURA¹⁾, M.D., Kayo OTSUKA¹⁾, M.D., Tadao UESUGI²⁾, C.T., I.A.C., Takaki CHIKUGO³⁾, M.D., Yuji YAGI⁴⁾, M.D., Takao SATO¹⁾, M.D., Shigeo HASHIMOTO¹⁾, M.D.

¹⁾Second Department of Pathology, ²⁾Section of Hospital Pathology, ³⁾First Department of Pathology, ⁴⁾Department of Neurology, Kinki University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎ 589 大阪狭山市大野東 377 の2 近畿大学医学部第2病理学教室 古田朋子

平成8年8月2日受付

平成8年10月18日受理

かつ、早期に治療を開始することが可能である¹⁾。しかしパパニコロー染色やライトギムザ染色では真菌の染色性は乏しく、かなり真菌が多いか重積していないとスクリーニングで真菌を発見することはきわめて困難であった。また、真菌菌糸の検索や形態観察に従来用いられてきたPAS染色、グロコット染色は手技が煩雑であった。今回、蛍光真菌染色液のファンギフローラY[®] (日本商事)を用いたため手技が簡便で、しかも細胞診での菌糸発見がきわめて容易であったアスペルギルス脳膿瘍の1剖検例を経験したので報告する。

II. 症 例

患 者 : 80歳、男性

主 訴 : 右眼窩部痛

既往歴 : 特記すべきことはなし

写真 1 頭部 MRI (冠状断) 像。右側頭葉にリング状エンハンスを認める

写真 2 脳断面像。右側頭葉に黄白色の中心部がくずれた膿瘍像を認める

写真 3 脳膿瘍組織像。凝固壊死部 (*) 周囲に異型多核巨細胞を認める (H-E 染色, $\times 4$)

現病歴：平成 7 年 1 月初旬、右眼窩部痛があり精査のため入院した。CT にて右眼窩先端部から蝶形骨洞にかけて異常陰影を認めた。腫瘍を疑い 2 月 8 日に生検を行ったところ、病理組織学的に菌糸塊とその周辺の炎症像が認められた。その際細胞診標本は作製されていない。残念ながらその検体の培養は行われなかったが、抗アスペルギルス抗体を用いた免疫組織化学で菌糸はアスペルギルスであると診断された。抗真菌剤のフルコナゾール投与で経過観察していたが同年 8 月から全身倦怠感、頭重感が出現したため、頭部 MRI を行ったところ、眼窩部の肉芽腫と側頭葉の脳膿瘍を疑う像を認めた (写真 1)。アンフォテリシン B の持続点滴を施行したところ、頭部 MRI 像で眼窩の肉芽腫像は縮小し、側頭葉の膿瘍像は消失した。髄液に真菌は認められず、脳真菌症の活動性がないとみなし、平成 8 年 3 月 12 日、抗真菌剤の投与を中止した。しかし一週間後の MRI では脳膿瘍像が再び出現したため抗真菌剤の再度投与を行ったが全身状態は徐々に悪

化し、4 月 11 日、永眠された。

剖検所見 (AN-3221)：頭部のみの剖検を施行した。開頭し脳を摘出後、MRI で確認されていた右側頭葉の膿瘍部分を狙って 21 ゲージの注射針で穿刺吸引し、黄緑色の膿汁が得られた。一部を培養検査に提出し残りの膿汁ですり合せ法により塗抹標本を作製し 95% のエタノールで一晩固定した。両側頭蓋底の硬膜、蝶形骨洞内にも膿汁が多量に認められ、髄液も混濁していた。脳重量は 1080 g、脳の断面では右側頭葉に黄白色で中心部がくずれた膿瘍を認めた (写真 2)。

組織所見：H-E 標本所見で、膿瘍部は好中球、リンパ球とともに凝固壊死物が多量に認められ、その周囲を取り囲んで組織球、異型多核巨細胞が層を形成するように認められた (写真 3)。膿瘍内やその周囲には真菌菌糸は認められにくい。膿瘍周辺部の多核巨細胞内にヘマトキシリンで淡染する菌糸が貪食されているのがわずかに観察された。明らかな血管炎の像は観察されなかった。それと同じ組織に表 1 a のような手順でファンギフローラ Y[®] 染色を行った。その光学顕微鏡観察では H-E 所見と同様菌糸はわずかしこ認められなかった (写真 4 a)。この部分を蛍光顕微鏡で観察すると膿瘍、膿瘍周囲の組織内に散在性に、多数の菌糸が観察された (写真 4 b)。

膿汁細胞診：剖検時作製された膿汁の塗抹標本に、表 1 b のごとくファンギフローラ Y[®] パパニコロー重染色を行った。

まず光学顕微鏡で観察したところ、通常のパパニコロー染色と同様の染色結果が得られた。背景は壊死状でその中に真菌菌糸が散在性に認められた。それらは部分的に重積し、集塊状であった。ライトグリーンに

表 1

a. ファンギフローラ Y [®] を用いた病理組織標本染色の手順
染色液として蛍光染色液ファンギフローラ Y [®] のキットを用いた。
A液(対向染色液)；変性ヘマトキシリン
B液(蛍光染色液)；スチルベンジルスルホン酸系蛍光染料 (pH 7.2, リン酸緩衝液)および共染防止剤
キットは上記の2液から成っている。
1；脳腫瘍部分のパラフィン切片を作製。
2；脱パラフィン後約1分間水洗。
3；A液で約2分間染色。
4；流水で約2分間水洗。
5；B液で3～5分間染色。
6；水道水に約20回出し入れして水洗。
7；アルコール脱水系列を通した後キシレンで透徹，無蛍光合成封入剤で封入。
8；UV励起法を用いた蛍光顕微鏡で観察。
b. ファンギフローラ Y [®] を用いた細胞診染色の手順
1；脳腫瘍部を穿刺吸引して得られた膿汁をすり合わせ法で塗抹標本にし，95%アルコールで固定。
2；流水で水洗後，B液で3～5分染色。
3；水道水に20回出し入れして水洗。
4；さらにパパニコロー染色を行い，アルコールで脱水，キシレンで透徹し，無蛍光合成封入剤で封入。
5；UV励起法を用いた蛍光顕微鏡で観察。

淡染する菌糸はY字型に2分岐し，隔壁を有しており，菌糸巾はほぼ一定であった。菌体はパパニコロー染色では淡染するためスクリーニングでは見落とす危険性があった。また，菌糸の先端部は不染性で，形態観察が困難な部分も多かった(写真5a)。

同標本を蛍光顕微鏡で観察すると，菌糸は強い蛍光を発して容易に見えてきた(写真5b)。菌糸の形態を明瞭に観察でき，隔壁，2分岐も多数認められた。さらにパパニコロー染色では不染であった菌糸先端もきわめて明瞭に観察された(写真5b)。

培養結果：Aspergillus fumigatus が分離された。

III. 考 察

中枢神経系真菌症の多くは重篤な全身性深在性真菌症の一部分症としてみられることが圧倒的に多く，中枢神経系のみを特異的に侵す真菌はほとんどない²⁾。深在性真菌症の基礎疾患としては白血病をはじめとする血液疾患，悪性固形腫瘍，膠原病などが多い。その理由は抗腫瘍剤や免疫抑制剤，副腎皮質ステロイド剤などの投与によって感染防御機能が著しく低下した患者に日和見感染症として深在性真菌症が発症すること

写真4 a：組織光学顕微鏡像，多核巨細胞内にわずかにアスペルギルス菌糸を認める。b：組織蛍光顕微鏡像，aと同視野，アスペルギルス菌糸を多数認める(a，b：ファンギフローラ Y[®]染色，×40)

が多いからである。深在性真菌症の原因菌はカンジダが最も多く次いでアスペルギルス，クリプトコッカス，ムーコルなどである³⁾が全身性真菌症における原因菌別の中枢神経病変の合併率は，クリプトコッカス症が21.3%で最も多く，次いでムーコル症7.5%，アスペルギルス症4.5%，カンジダ症2.7%である。それらの合併率は諸施設によって若干異なるが原因菌はおおむね前述したものである。

今回経験した症例は副鼻腔にアスペルギルス感染症を来し，不幸にして脳内に進展し膿瘍を形成したものである。本邦において副鼻腔真菌症はまれな疾患とされてきたが近年その報告例は増加している。副鼻腔真菌症の特徴としては他の部位の深在性真菌症と異なり日和見感染症として発症する例はほとんどない⁴⁾。同様に今回の症例も基礎疾患を持たなかった。

副鼻腔真菌症の原因菌種はアスペルギルスが最も多く半数以上を占め，次いでムーコル，カンジダである。一般にアスペルギルスによる副鼻腔真菌症は症状も軽く，上顎洞洗浄や抗真菌剤投与により予後は良好

写真 5 a : 細胞診光学顕微鏡像。アスペルギルス菌糸は淡染している。染色されない部分もある。b : 細胞診蛍光顕微鏡像。a と同視野。菌糸は強い蛍光を発する (a, b : ファンギフローラ Y[®] パパニコロー重染色, $\times 40$)

とされている。しかし今回の症例のように脳膿瘍にまで至る例があることを知っておくべきであり、臨床的な管理が重要である。

真菌症の細胞診については肺、副鼻腔アスペルギルス症の報告⁵⁻⁷⁾があるものの他の多くの症例では菌糸形態を明瞭に観察できることは少なく、スクリーニングにも役立ちしかも細部の菌糸形態観察までも可能な染色が待たれていた。今回ファンギフローラ Y[®] により蛍光顕微鏡下では対物 10 倍でのスクリーニングで菌体を簡単に発見でき、しかも光学顕微鏡下では不染色であった菌体部分も明瞭な蛍光を発し形態が容易に観察できた。なお、これまでファンギフローラ Y[®] と H-E 染色の重染色の報告⁸⁾はあったが、ファンギフローラ Y[®] とパパニコロー染色の重染色の試みはわれわれの知る限り報告されていない。

真菌を検出する際はグロコット染色がかなり有用でファンギフローラ Y[®] 染色と同等に真菌形態の観察に役立つ。しかし残念ながら一度染色してしまうと細胞診の背景および他の真菌以外の細胞が観察不可能にな

ってしまうことが次点である。また、PAS 染色はカンジダなどを染色するにあたってはかなり有効であるけれどもアスペルギルスはやや薄く染まってしまう、ファンギフローラ Y[®] やグロコット染色には及ばない。

蛍光顕微鏡がない施設ではファンギフローラ Y[®] 染色は利用できないが、少なくとも蛍光顕微鏡のある施設では深在性真菌症を疑う症例に、従来のパパニコロー染色による細胞診に加え、積極的にファンギフローラ Y[®] 染色を行う必要があると思われる。

抗アスペルギルス抗体を用いた免疫染色をお願いしました信州大学医学部第 2 病理学教室、発地雅夫教授に深謝致します。

Summary

We report an autopsy case of *Aspergillus* brain abscess that had extended from *Aspergillus* sinusitis, and attempted to detect the fungus in cytology specimens by Fungiflora Y[®] and Papanicolaou double staining. An 80-year-old man was found to have right orbital and sphenoidal aspergillosis. Treatment with antifungal agents was ineffective, and a brain abscess was detected by magnetic resonance imaging seven months later. The patient's condition deteriorated and he died. Pus from the brain abscess was used to make smear and Fungiflora Y[®]-Papanicolaou double staining was performed. It was difficult to detect the fungi on screening with the $\times 10$ objective lens of light microscope because of their faint color. However, under a fluorescence microscope the fungal hyphae were apple green and it was very easy to detect them. Thus, Fungiflora Y[®]-Papanicolaou double staining seems very useful for detecting fungal hyphae on smear cytology.

文 献

- 1) 物部泰昌, 森谷卓也, 広川満良, 鐵原拓雄, 阿多雄之. 穿刺直後の Diff-Quik 染色迅速診断が早期治療開始に有用であった肺アスペルギルス症の一例. 日臨細胞誌岡山支部会誌 1993; 11: 12: 79~80.
- 2) 青山 弘, 森 亘. 中枢神経真菌症の病理. 神経内科 1986; 25: 211~229.
- 3) 奥平雅彦. Opportunistic fungus infection の病理. 日病会誌 1985; 74: 61~91.
- 4) 市村恵一. 副鼻腔の病態, 真菌症を中心に. 野村恭也, 本庄 巖. 耳鼻咽喉科頭頸部外科 MOOK 1 副鼻腔

- 炎. 東京: 金原出版, 1986: 69~74.
- 5) 木村雅友, 佐藤隆夫, 門田永治, 丹治 紅, 蛭間真悟, 前田光代・ほか, アスペルギルスの判定に細胞診が有用であった1例. 日臨細胞誌 1989; 28: 547~551.
 - 6) 木村雅友, 下戸 隆, 上杉忠雄, 宇野重利, 橋本重夫. 肺アスペルギローマの1例. 日臨細胞誌 1995; 34: 1218~1219.
 - 7) 木村雅友, 宇野重利, 上杉忠雄, 前田光代, 佐藤隆夫. 上顎洞真菌症の1例. 日臨細胞誌 1994; 33: 575~576.
 - 8) 直江史郎, 渋谷和俊. 真菌用蛍光染色液ファンギフローラY®, 日本商事株式会社; 資料
-