

## 涙液分泌減少症における結膜のブラッシュ サイトロロジー

坪田 一男\*, 宇賀神作次郎\*\*, 長谷川寿彦\*\*\*, 梶原 一人\* \*\*\*\*

\*国立栃木病院眼科, 慶応義塾大学医学部眼科学教室, \*\*国立栃木病院病理検査部

\*\*\*国立栃木病院産婦人科, \*\*\*\*大田原赤十字病院眼科

### 要 約

結膜細胞診を行うための特殊ブラシを開発しこれを用いて涙液分泌減少症患者の結膜細胞診を行った。採取された細胞をパパニコロ染色し、中層細胞、基底細胞、結膜杯細胞、角化細胞の4種類に分類し(-)より(++)までの半定量的評価を行った。正常群では結膜杯細胞は常に認められ、角化細胞はほとんど認められないが、涙液分泌減少症患者群では結膜杯細胞は減少し角化細胞が増加していた。特殊ブラシを用いた結膜のブラッシュサイトロロジーは涙液分泌減少症の評価に使用できるものと考えられた。(日眼会誌 94:224-230, 1990)

キーワード: ドライアイ, 涙液分泌減少症, ブラッシュサイトロロジー, 結膜細胞診, 検査法

## Brush Cytology for the Evaluation of Dry-Eye

Kazuo Tsubota\*, Sakujiro Ugajin\*\*, Toshihiko Hasegawa\*\*\* and Kazuto Kajiwara\* \*\*\*\*

\*Department of Ophthalmology, National Tochigi Hospital; and Keio University School of Medicine

\*\*Department of Pathology, National Tochigi Hospital

\*\*\*Department of Gynecology, National Tochigi Hospital

\*\*\*\*Department of Ophthalmology, Ohtawara Red Cross Hospital

### Abstract

A special brush was developed for collection of conjunctival cells with better integrity of the harvested specimens. Using this brush, cells were collected from temporal bulbar conjunctiva of 20 normal eyes and 40 eyes with dry-eye, and were stained by the modified Papanicolaou method. Keratinized cells (K) and goblet cells (G) were classified into 5 categories, from (-) to (++) according to the numbers of the cells observed. Normal eyes were categorized as K (-): 16, K (±): 4, G (+): 2, G (++) : 18. Eyes with dry-eye were K (-): 3, K (±): 8, K (+) 13, K (++) : 11, K (++) : 5, and G (-): 7, G (±): 7, G (+): 22, G (++) : 4. Clinical severity and the rose Bengal score corresponded to these categories. This technique can detect cytological changes in conjunctival cells in terms of shape and quality of staining. Eyes with dry-eye could be evaluated in relation to the numbers of keratinized cells and goblet cells. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 224-230, 1990)

Key words: Dry-eye, Hypolacrimia, Brush Cytology, Conjunctival Cytology, Test

別刷請求先: 320 栃木県宇都宮市中戸祭1-10-37 国立栃木病院眼科 坪田 一男  
(平成元年6月16日受付, 平成元年8月22日受理)

Reprint requests to: Kazuo Tsubota, M.D., National Tochigi Hospital,  
1-10-37 Nakatomatsuri, Utsunomiya, Tochigi, Japan 320

(Received June 16, 1989 and accepted August 22, 1989)

## I 緒 言

涙液分泌減少症では、様々な変化が角結膜に起きており臨床的にはローズベンガルテストや、フルオレセイン染色によって染まる細胞の出現が特徴的である。これらの異常細胞を検出するための擦過細胞診にあたっては、その採取方法が重要であり細胞の形、染色性を失わずなおかつ、細胞採取による侵襲を少なくすることが必要とされる。特殊なブラシを用いたブラッシュサイトロジーはこの目的に適しており、球結膜の細胞診を簡便に行うことができることが報告されている<sup>1)2)</sup>。今回我々はこのブラシを更に改良して涙液分泌減少症患者にブラッシュサイトロジーを施行し、半定量的な評価を行って診断および疾患の程度分類に使用できるか否か検討を加えた。

## II 方 法

### 対象

涙液分泌減少症群としては自覚症状があり、細隙灯顕微鏡所見、綿糸法、シルマーテスト、ローズベンガルテストにより涙液分泌減少症と診断した男性3例、女性17例の20例40眼を対象とした。平均年齢は53.6±10.9歳であった。コントロールとしては自覚症状がなく涙液分泌が正常と思われる医療従事者および同意を得た白内障手術前患者、男性3例、女性7例の計10例20眼をコントロールとして採択した。平均年齢は55.6±18.0歳で、全例において綿糸法20mm以上、シルマーテスト10mm以上、ローズベンガルテスト陰性であった。

### 検査方法

綿糸法は浜野ら<sup>3)</sup>の方法に従い、シルマーテストはシルマー-II<sup>4)</sup>検査を用いた。ローズベンガル検査は球結膜、角膜の染色の程度をスコア化し1点より9点までに分類した<sup>5)6)</sup>。ブラッシュサイトロジーは新しく開発した特殊ブラシを用いて両眼共耳側球結膜にて施行した。このブラシは従来のものに比べて毛が格段に細く、小さいため侵襲が少なく、眼瞼皮膚の細胞の混入が少ない利点を有している(図1a, b)。採取された細胞はハンクス緩衝液に入れ浮遊させた後、ミリポアフィルターに集めパバニコロ染色(Pap染色)を行った<sup>1)</sup>。

### 細胞の評価

採取された細胞はその形、染色性より主に中層系細胞(I)、基底細胞(B)、結膜杯細胞(G)、角化細胞

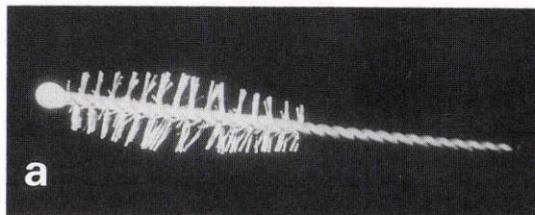


図1a 新しく開発されたサイトブラシ。2ミリの毛が6ミリにわたって植えられている。毛の直径は十分に細い。

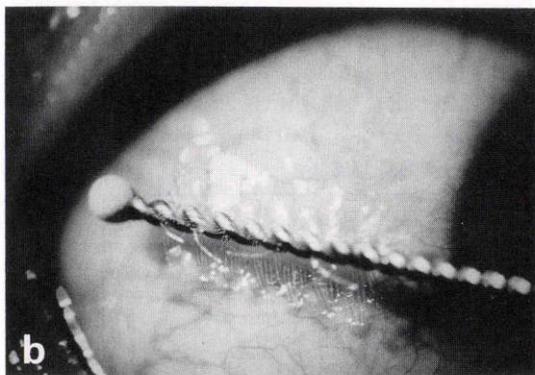


図1b 採取にあたってはブラシの端より5cmのところを持ち、結膜に1g以上の加重が加わらないように行う。基本的にはブラシを7回上下にこするだけで十分量が採取できる。

表1 ブラッシュサイトロジーのスコア

程度分類	
(-)	標本中のどこにもみあたらない。
(±)	標本の一部に少しみつかると。
(+)	数視野の一つみつかると。
(#)	どの視野にも一つ以上みつかると。
(##)	どの視野にも数個以上みつかると。

(K)の4種類に分類した<sup>1)</sup>。その数を半定量的に(-)より(##)まで表1のような基準を設けて5段階に分けた。またこの4種類に分類できないものはそれぞれの検体について別に記載するかまたは検査の対象より除外した。

## III 結 果

涙液分泌減少症では20例40眼中角化細胞数(±)以上は37眼93%、角化細胞(+)以上では29眼73%、結膜杯細胞数(+)以下では36眼90%、結膜杯細胞数(±)以下では14眼35%となった。角化細胞を全く認めな

かったものは3眼7%に過ぎなかった(表2a)。中層細胞, 基底細胞はそれぞれ8眼と7眼において(++)より減少していることがあった。典型的な涙液分泌減少症の細胞像を図2a, bに示すがこれはK(+) I(++) B(++) G(±)と表現できる。この他に涙液分泌減少症では紡錐形の細胞(図3a)や核がコーヒー豆状になった細胞(図3b)がそれぞれ4眼ずつ認められた。

正常コントロール群では角化細胞は観察されず, 10例20眼中81歳女性と, 78歳女性の2例4眼においてK

表2a 涙液分泌減少症群における4種類の細胞の半定量分類(N=40)  
中層細胞(I), 基底細胞(B), 結膜杯細胞(G), 角化細胞(K)

涙液分泌減少症

	K	I	B	G
—	3			7
±	8			7
+	13		1	22
++	11	8	6	4
+++	5	32	33	
計	40	40	40	40

a

表2b 正常群における4種類の細胞の半定量分類(N=20)  
中層細胞(I), 基底細胞(B), 結膜杯細胞(G), 角化細胞(K)

正常群

	K	I	B	G
—	16			
±	4			
+				2
++				18
+++		20	20	
計	20	20	20	20

b

(±)となった以外はK(—)であった(表2b)。中層細胞, 基底細胞は豊富に観察され全例においてI(++), B(++)と表現できた。結膜杯細胞は16歳男性の1例2眼がG(+)となった以外は(+)であり, 10例中7例14眼においてK(—) I(++) B(++) G(++)と表現できた。典型的な正常群の細胞の弱拡大および強拡大にて図4a, bに示す。またこの検査では全例において左右差を認めるものはなかった。

涙液分泌減少症群の臨床検査のシルマーテスト10mm未満は40眼中27眼68%, 綿糸法20mm未満は26眼65%, ローズベンガルスコア1点以上は35眼88%であり, これらの結果と角化細胞スコアの関係を示したのが図4a, b, cである。綿糸法, シルマーテストとの間に明らかな関係は認められなかったが, ローズベンガルスコアとの間には関係が認められ, 角化細胞数

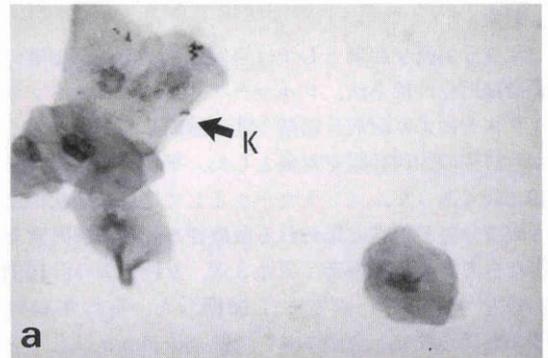


図2a 涙液分泌減少症患者(57歳, 女性)の結膜細胞所見。核が小さく細胞質の大きい角化細胞(K)が識別される。(パパニコロ染色, 強拡大)

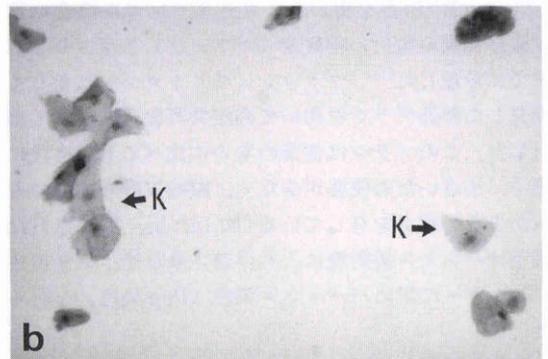


図2b 涙液分泌減少症患者(57歳, 女性)の結膜細胞所見。角化細胞(K)が多数認められる。細胞数は(++)と分類された(パパニコロ染色, 弱拡大)

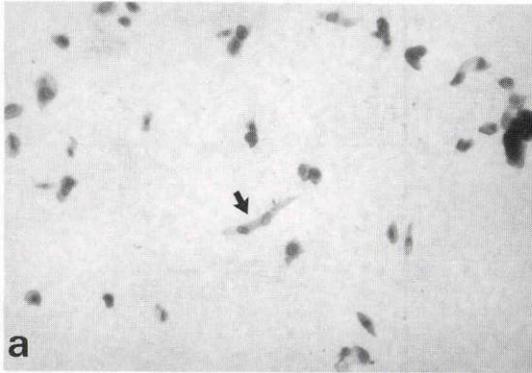


図3a 涙液分泌減少症に時に認められる紡錐形細胞(60歳, 女性). 基本的には中層系細胞と思われるが, その形は紡錐形をしている(矢印).

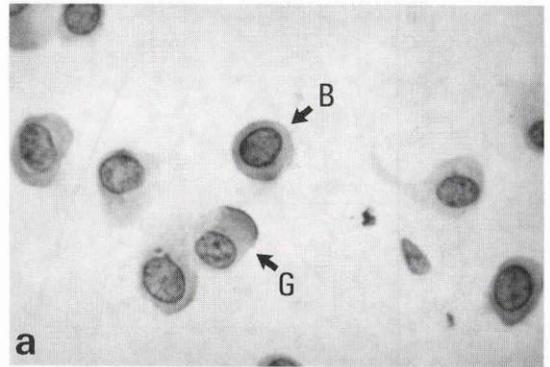


図4a 正常者(55歳, 女性)の結膜細胞所見. 基底細胞(B), 結膜杯細胞(G)がはっきりと識別できる(パバニコロ染色, 強拡大)

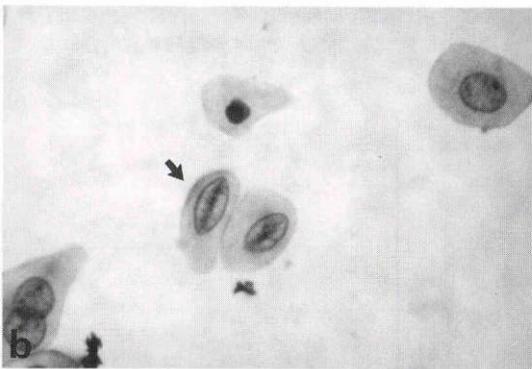


図3b 涙液分泌減少症に時に認められるコーヒー豆の形をした核を持つ細胞(39歳, 女性). 細胞質, 染色性は異常を認めない.

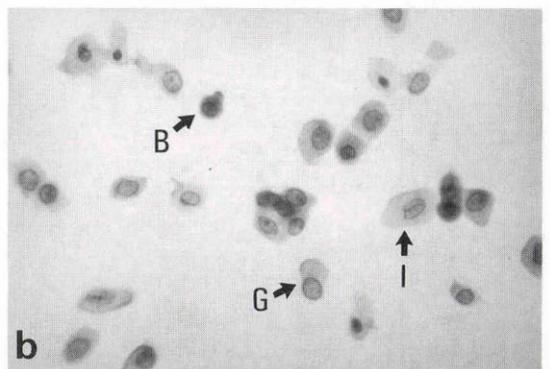


図4b 正常者(55歳, 女性)の結膜細胞所見. 中層細胞(I), 基底細胞(B), 結膜杯細胞(G)が多数認められる(パバニコロ染色, 弱拡大)

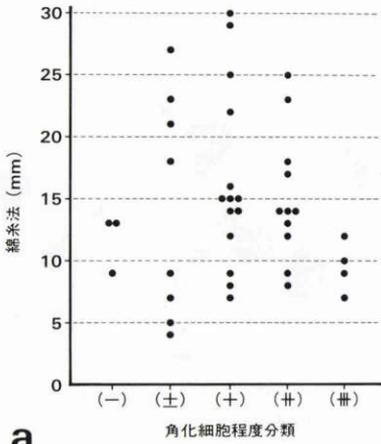
が増えるに従ってローズベンガルスコアも上昇する傾向があった。図5a, b, cは綿糸法, シルマーテスト, ローズベンガルスコアと結膜杯細胞スコアの関係を示したものであるが明らかな関係は認められなかった。

#### IV 考 按

細胞診は顕微鏡下にて疾患を細胞レベルで検索する方法であり, 産婦人科領域を中心に主に癌の検診として発達してきた。粘膜の細胞に用いられることが多く, 結膜組織は表面に露出している粘膜組織であり細胞診が比較的施行しやすい部位と考えられる。眼科領域では従来綿棒を用いる方法があったが採取効率や染色性, 細胞の識別に難点があり広く臨床応用されていなかった<sup>1)</sup>。今回我々の開発した特殊ブラシは非常に柔

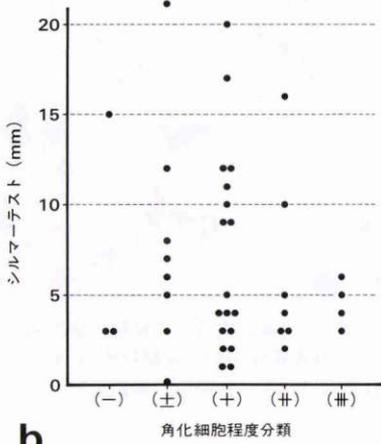
らかい毛を用い, 小型化したため侵襲も少なく従来の問題点を軽減したため, 広い臨床応用が可能となったと思われる<sup>2)</sup>。

正常群にて採取された細胞を観察すると, 中層細胞, 基底細胞, 結膜杯細胞が主にみられる。角化細胞が(±)出現しているのは高齢の2例のみであり, 正常結膜ではほぼ角化細胞が観察されないと考えてよいと思われる。この2例は自覚症状, 臨床検査とも涙液分泌減少症を示唆するものは存在しないが, 加齢により角化細胞が出現した可能性もあり将来の検討を要する。角化細胞はブラッシュサイトロジーによりPap染色を行うと図2のようにはっきりとオレンジ色に識別することができ, 評価が大変しやすい。細胞の角化は細胞内のケラチンが増加して起こるものであり, 皮膚細胞は正常において角化するが結膜細胞では角化が起きない



a

図 5a 涙液分泌減少症における綿糸法と角化細胞スコアの関係。明らかな関係は認められない。

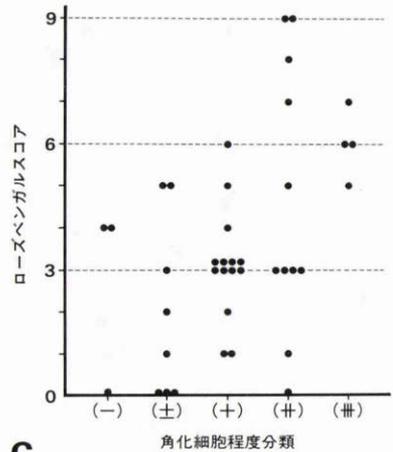


b

図 5b 涙液分泌減少症におけるシルマーテストと角化細胞スコアの関係。明らかな関係は認められない。

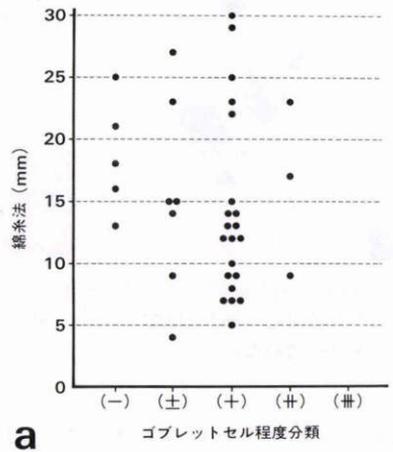
と考えられている。

ケラチンは元来広義には表皮，毛，爪などの表皮細胞由来の構造を形成する繊維性不溶性タンパク質をさすが，現在ではケラチン型中間径フィラメント（keratin intermediate filament）を構成する単位ペプチドを意味しており，ヒトではタイプ1に11種類，タイプ2に8種類のケラチンが認められている<sup>7)</sup>。外傷や，培養などの条件においては増殖性マーカーのケラチンが出現することが知られており<sup>8)</sup>，また，培養表皮細胞においてコロニーの表面が空気に触れるようにすると角化のマーカーであるケラチンが合成されると報告されている<sup>9)</sup>。同様に涙液分泌減少症でも表面細胞が直接



c

図 5c 涙液分泌減少症におけるローズベンガルスコアと角化細胞スコアの関係。スコアが増加するにつれて角化細胞数が増加する傾向が認められる。



a

図 6a 涙液分泌減少症における綿糸法と結膜杯細胞スコアの関係。明らかな関係は認められない。

空気に触れることが分化型ケラチンの増生を引き起こす可能性がある。そのように考えると従来のインプレッションサイトロジーを用いた定性的検査でも報告されているように，角化細胞の出現が涙液分泌減少症のひとつのパラメーターとして使用できると考えられる<sup>10)</sup>。

結膜杯細胞は正常群では1例2眼を除いて(++)認められ，耳側球結膜では正常において存在していると考えられる。この細胞は涙液の一部であるムチンを産生している細胞であり，PAS染色を用いたインプレッションサイトロジーでも涙液分泌減少症においてその

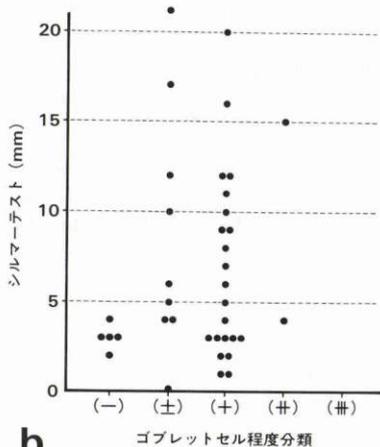


図 6b 涙液分泌減少症におけるシルマーテストと結膜杯細胞スコアの関係。明らかな関係は認められない。

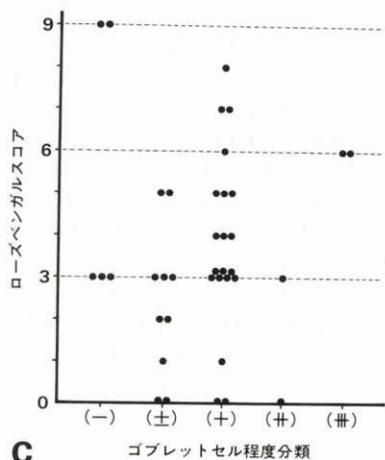


図 6c 涙液分泌減少症におけるローズベンガルスコアと結膜杯細胞スコアの関係。明らかな関係は認められない。

減少が報告されているが<sup>10)</sup>、今回の結果でもその傾向が認められた。

これらの細胞の他に紡錘形をした細胞が少数認められたが、この紡錘形細胞の出現の意味についてははっきりしない。結膜細胞と密接な関係を有する角膜上皮細胞では、角膜移植や角膜ヘルペスの時に紡錘形細胞の出現が報告されており<sup>11)~13)</sup>、なんらかの創傷治癒過程を反映していることが考えられている。涙液分泌減少症においては細胞分裂が盛んとなることが示唆されているが<sup>14)</sup>、結膜レベルでもなんらかの創傷治癒過程

が起きている可能性も否定できない。またコーヒー豆のような多数の核が認められた症例が2例4眼あった。どのような変化にせよ、核の形態が変化していることは正常状態とは異なる状態にあると考えられ、これらの細胞の意味についてはさらに検討をしてゆく必要があると思われる。

涙液分泌減少症では確定診断を行える良い検査法がないことはよく知られている<sup>15)</sup>。今回の研究においても綿糸法の陽性率(20mm以下)は65%、シルマーテストでは68%と低かった。ローズベンガルスコアでは88%と高い陽性率となったがそれでも12%の陰性率となっている。近年涙液中のラクトフェリンを測定する方法や、涙液の蒸発率を測定する方法が開発され<sup>17)</sup>、その将来性が期待されているが未だ広く臨床応用に至っていない。今回用いた結膜のブラッシュサイトロジーでは角化細胞数(±)以上を陽性とするとなれば93%とかなり高い陽性率を示し(False Positive=20%, False Negative=7%)、(+)以上から陽性をとっても73%の陽性率となり(False Positive=0%, False Negative=27%)シルマーテストや綿糸法より感受性の高い検査法となっている。結膜杯細胞数では(+)以下で陽性とするとなれば90%(False Positive=10%, False Negative=10%)、(±)以下では35%(False Positive=0%, False Negative=65%)となり、本検査法の有用性を示している。また当院で行っているようにサイトブラシで採取した細胞は、ハンクス緩衝液に浮遊させ泌尿器科などで日常的に行っている尿の細胞診検査手順を使用することができる。これは大学病院や総合病院などのような臨床検査室を備えているところでは簡単に依頼できる検査であり、大きな利点と考えられる。

臨床検査法との相関関係については角化細胞数とローズベンガルスコアに関係が認められただけであった。シルマーテストが5mm以下の明らかな涙液分泌減少症であっても角化細胞が認められなかったり、またローズベンガルスコアが4以上であっても角化細胞が全く認められないことは、涙液分泌減少症が単一の疾患ではなくて、種々の疾患の集合である可能性を示している。涙液分泌減少症は3層の涙液と角結膜の複雑な要素がからんで起きてくるものと思われ、疾患のサブカテゴリー化を行っていくとともに、ブラッシュサイトロジーにより細胞レベルでの評価が重要であると思われる。

涙液分泌減少症では結膜のブラッシュサイトロジー

を行うことにより角化細胞の増加と結膜杯細胞の減少を半定量的に評価することができた。本方法は簡便な細胞診であり、さまざまな治療法の客観的評価をはじめとして涙液分泌減少症の程度分類に使用できるものと思われる。

本論文の一部は第93回日本眼科学会にて発表した。ご校閲下さいました慶応義塾大学眼科植村恭夫教授に深謝致します。また綿糸をご提供下さりご助言を頂きました大阪大学眼科浜野 光先生、ブランの開発に御協力頂きました帝國臓器(株)に感謝致します。本研究は平成元年度栃木県アイバンク研究助成金の補助を受けた。

#### 文 献

- 1) 坪田一男, 宇賀神作次郎, 長谷川寿彦, 他: 結膜のブラッシュサイトロジー. 眼紀, 40: 1519-1523, 1989.
- 2) Tsubota K, Kajiwara K, Ugajin S, et al: Conjunctival Brush cytology: Acta Cytologica in press, 1989.
- 3) 浜野 光, 堀 正樹, 光永サチ子, 他: 涙の量的検査—フェノールレッドによる着色綿糸を用いる方法—日コレ誌 24: 103-107, 1982.
- 4) Milder B: The Lacrimal apparatus. Adler's physiology of the eye (Ed. Moses RA) pp21-25. The CV Mosby Company, St. Louis, 1987.
- 5) Gilbert JP, Farris RL, Santamaria J, et al: Tear osmolarity and ocular surface disease in keratoconjunctivitis sicca. Arch Ophthalmol 96: 677-681, 1978.
- 6) 浜野 孝, 大橋裕一, 趙 容子, 他: 涙点プラグの開発と臨床応用成績. 臨眼 40: 1063-1067, 1986.
- 7) Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11-24, 1982.
- 8) Stoler A, Kopan R, Duvic M, et al: Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. J Cell Biol 107: 427-446, 1988.
- 9) Regnier M, Schweizer J, Michel S, et al: Expression of high molecular weight (67K) keratin in human keratinocytes cultured on dead de-epidermized dermis. Exp Cell Res 165: 63-72, 1986.
- 10) Tseng SCG.: Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. Ophthalmology 92: 728-733, 1985.
- 11) Lohman LE, Rao GN, Aquauella JV, et al: In vivo microscopic observations of human corneal epithelial abnormalities. Am J Ophthalmol 93: 210-217, 1982.
- 12) 坪田一男: 角膜上皮のカラーズペキュラーマイクロスコブ撮影. 臨眼 43: 997-999, 1989.
- 13) 坪田一男, 高村悦子: 角膜ヘルペスにおける角膜上皮のスペキュラーマイクロスコブ検査. あたらしい眼科 6: 617-621, 1989.
- 14) Lemp MA, Gold JG: An in vivo study of the corneal surface in keratoconjunctivitis sicca. Trans Ophthalmol Soc UK 104: 436-438, 1985.
- 15) Matthew BG, Goren SB: Diagnostic tests in patients with symptoms of keratoconjunctivitis sicca. Am J Ophthalmol 106: 570-574, 1988.
- 16) von Bijsterveld OP: Diagnostic tests in the sicca syndrome. Arch Ophthalmol 82: 10-14, 1969.