

新しいメンブランフィルター (PORETEC®) による 眼科領域の細胞診

小幡 博人¹⁾²⁾, 堀内 啓¹⁾, 佐藤 泰広²⁾, 佐藤 孜²⁾, 鈴木 雅信²⁾, 浦田 謙二²⁾
大矢 智博²⁾, 小笠原勝則²⁾, 宮田 和典²⁾, 江口秀一郎²⁾, 水流 忠彦³⁾

¹⁾東京大学医学部病理学教室, ²⁾東京大学医学部眼科学教室

³⁾東京大学医学部付属病院角膜移植部

要 約

新しいメンブランフィルターを用いた集細胞器 (PORETEC®) が開発され, 微量液状検体においても細胞収集率が高く, 背景の共染のない鮮明な細胞診標本を簡便に作製することが可能となった. 本法による細胞収集率を検討するため, 結膜上皮のブラッシュサイトロジー検体6例を用いて, 本法と自動細胞収集 (オートスメア®) 法による各々標本作製し, 比較した. その結果, 本法の方が自動細胞収集法より平均で約2.5倍の集細胞数が得られた. また, 本法を用いることにより, 前房水, 硝子体切除検体, 角結膜上皮検体などの少量の細胞診検体から良好な標本作製することが可能であった. 免疫染色も可能であり, 今後, 日常臨床における種々の疾患の診断や治療などに幅広く応用できると考えられた. (日眼会誌 97:1179-1184, 1993)

キーワード: メンブランフィルター, 細胞病理学, 眼液状検体, 結膜上皮, ブラッシュサイトロジー

New Membrane Filter (PORETEC®) Method for Ocular Diagnostic Cytopathology

Hiroto Obata¹⁾²⁾, Hajime Horiuchi¹⁾, Yasuhiro Sato²⁾,
Tutomu Sato²⁾, Masanobu Suzuki²⁾, Kenji Urata²⁾,
Tomohiro Oya²⁾, Katsunori Ogasawara²⁾, Kazunori Miyata²⁾,
Shuichiro Eguchi²⁾ and Tadahiko Tsuru³⁾

¹⁾Department of Pathology, University of Tokyo School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

³⁾Section of Corneal Transplantation, University of Tokyo Hospital

Abstract

We describe a new membrane filter (PORETEC®) technique for processing cytopathologic fluid specimens. This procedure provides excellent cytologic preparations because there is no background staining and only a small amount of fluid specimen is necessary, as there is little cell loss. We compared the number of cells collected by the membrane filter technique with that collected by cytocentrifugation using conjunctival brush cytology specimens from 6 subjects. The number of cells obtained by the new method was significantly higher than that obtained by the cytocentrifugation technique. This

別刷請求先: 113 文京区本郷7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 小幡 博人

(平成5年3月31日受付, 平成5年5月17日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroto Obata M.D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

(Received March 31, 1993 and accepted in revised form May 17, 1993)

method was very useful for ocular fluid specimens such as aqueous humor, vitreous specimens, and scrapings from the cornea and conjunctiva. We showed some examples of these specimens including immunocytochemical staining done by this method. We confirm that this is valuable for diagnostic cytopathologic study of various fluid specimens in ophthalmology. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1179-1184, 1993)

Key words: Membrane filter, Cytopathology, Ocular fluid specimens, Conjunctival epithelium, Brush cytology

I 緒 言

眼科領域における前房水、硝子体切除液、角結膜上皮などの細胞診検体は小容量のものが多く、液状検体から細胞診標本を作製するには、従来からすり合わせ法や引きガラス法などによる塗抹法が一般的である¹⁾。また、細胞成分が少量と思われる液状検体では、ミリポアフィルターなどを用いた膜濾過法や自動細胞収集（自動遠心塗抹）法を用いた集細胞法が用いられる^{1)~5)}。従来の塗抹法や自動細胞収集法によりスライドガラス上に集められた検体は、固定や染色の際に細胞の剥離が起こりやすく、細胞収集率はあまり高くない。また、ミリポアフィルターなどのセルロース膜に集められた検体は、膜そのものが共染し、観察の際に支障をきたす場合がある。

近年、メンブランフィルターを用いた新しい集細胞器(PORETEC®、センシンメディカル、東京)が開発され、細胞収集率が高く、背景の共染のない鮮明な標本を作製することが可能となった^{6)~9)}。本法では、ギムザ染色やperiodic acid Schiff (PAS) 染色などの特殊染色も可能である。今回我々は、結膜のブラッシュサイトロジー検体を用い、本メンブランフィルター法と自動細胞収集法にて各々標本を作製し、両者での集細胞数を比較したので報告する。また、本法を用いて作製した種々の臨床検体の細胞診標本についても報告する。

II 対象と方法

健康成人男性5人6眼（平均年齢33±4歳）の耳側球結膜をサイトブラシ¹⁰⁾にて14回擦過し、直ちに2 mlの0.1 M リン酸緩衝生理食塩液（pH 7.4）に浮遊させた。Vortex mixerによりすばやく攪拌後、1 mlはポリ-L-リジンを塗布したスライドガラス上に自動細胞収集装置（オートスメア®、サクラ精機、東京）にて1,500回転、5分間遠心させ検体採取した。また、残

りの1 mlはメンブランフィルターにより細胞を採取した。メンブランフィルターによる標本作製法については、次項にて記述する。各検体は95% エタノールに5分間固定後、ババニコロウ染色を施行した。各々の標本の観察方法は、接眼レンズ（10倍）に7×7方眼マイクロメーター（オリンパス光学、東京）を組み込んだものと対物レンズ4倍の光学顕微鏡を用い、上下左右に視野が重なることなく標本全視野を移動させ、全細胞数を算定し、比較した。

また、本法を用いて以下の症例から得られた検体のババニコロウ染色標本の作製を行った。

症例1は、水晶体囊外摘出術および眼内レンズ挿入術後、約2年後に発症したぶどう膜炎の症例（71歳女性）で、27 G 針により前房穿刺を行い前房水約0.1 mlを採取した。症例2は、前房蓄膿を伴う原因不明のぶどう膜炎の症例（69歳男性）で、同様に前房水約0.1 mlを採取した。症例3は、増殖糖尿病網膜症（52歳男性）に対して硝子体切除術を施行した症例で、切除硝子体約2 mlを検体とした。症例4は、眼内レンズ手術後の眼内炎（70歳男性）に対して硝子体切除術を施行した症例で、切除硝子体約2 mlを検体とした。

さらに、本フィルターを用いて免疫染色を試みるため、健康成人（28歳男性）の結膜のブラッシュサイトロジー検体に対し、抗ケラチンモノクローナル抗体AE1（200倍希釈：ICN ImmunoBiologicals, USA）を用いて酵素抗体法（ヒストファイン®・ストレプトアビジン・ビオチンキット、ニチレイ、東京）を施行した。

メンブランフィルターを用いた集細胞器（PORETEC®）による細胞診標本の作製法

PORETEC®キットは、1：ベースホルダー、2：円筒キャップ、3：磁石式取り出し器具、4：スパーサー、5：メンブランフィルター、6：専用スライドガラスからなる（図1a）。これらを組み立て、円筒キャップの上から検体を注入し、ディスパーザブルのシリンジに

表1 オートスメア®法と PORETEC®法の集細胞数の結果

No.	年齢/性	オートスメア®	PORETEC®
1	37 男性	5,506	13,330
2	29 男性	3,187	8,011
3	29 男性	3,218	10,638
4	29 男性	1,923	7,155
5	29 男性	7,741	12,310
6	31 男性	8,022	23,189

(数値は集細胞数を表す)

てゆっくりと吸引濾過塗抹を行った(図1b)。吸引終了後、円筒キャップをはずし、取り出したフィルターを磁石式取り出し器具に装着し、速やかに95%エタノールに5分間固定した。固定後、通常のババニコロウ染色を行った。脱水、透徹後は、フィルターをステンレスの枠から剝離し、白色に特殊コーティングされた専用のスライドガラスにのせ封入した。

III 結 果

全検体6例の集細胞数の結果を表1に示す。オートスメア®標本では、 $4,933 \pm 2,338$ 個(平均値 $\pm$ 標準偏差)、メンブランフィルター(PORETEC®)標本では、 $12,436 \pm 5,281$ 個(平均値 $\pm$ 標準偏差)の細胞が採取された。個々の検体に細胞数の差はあるものの、いずれの検体においてもメンブランフィルターの方が高い集細胞数が得られており(平均2.52倍)、両者の集細胞数に統計学的な有意差を認めた(Wilcoxon検定、 $p < 0.05$)。また、オートスメア®標本では、細胞の辺縁がめくれあがるような変形した細胞が一部にみられ(図2a)、遠心によるアーチファクトと考えられた。一方、メンブランフィルター標本では、このような形態異常は認められず、類円形の核をもつ胞体の豊かな結膜上皮細胞が観察された(図2b)。

症例1では、細隙灯検査で多数の細胞が観察されたが、標本では多数のリンパ球と少数のマクロファージが観察された(図3)。症例2では、多数の好中球と少数のマクロファージ、リンパ球が観察された(図4)。症例3では、塊状の切除された硝子体の中に紡錘形の著しく長い細胞と類円形の核を持つ細胞が観察された(図5)。症例4では、多数の好中球が観察された(図6)。

免疫染色の結果を図7に示す。細胞質内に茶褐色の陽性像が見られ、その背景は共染がなく鮮明である。

IV 考 按

眼科領域において、細胞診検査が診断ならびに治療に有用な疾患として、眼内炎、ぶどう膜炎、眼内腫瘍、続発緑内障、角結膜上皮の感染症・腫瘍などがあげられる³⁾。これらの疾患に対し、必要に応じて前房水、硝子体切除検体、上皮擦過物などの検体を用いて、適切な標本作製することは極めて重要である。しかし、前房水は約0.1 mlほどの少量しか採取されず、従来の方法ではほとんど細胞成分が観察されないことも少なくはない。また、硝子体切除検体の場合は、個々の細胞単位というより比較的大きな硝子体塊として検体が得られることが多く、このような場合、標本作製の過程でスライドガラスから剝がれ落ちることがある。

新しいメンブランフィルター法は、従来の方法に比べ細胞収集率の高いことが知られている^{6)~9)}。平田ら⁷⁾は、1,200 個/mlになるように調整した吉田肉腫の生食細胞浮遊液1 mlを用いて標本作製を行い、標本中の細胞数と検体中の細胞数との比を細胞収集率として算出したところ、本メンブランフィルター法では82%、オートスメア®法では62%、すり合わせ法では54%であったという。このように細胞収集率が高いということは、細胞成分の少ない検体を無駄にすることなく、より正確な診断が下せる、少量の検体採取ですむことから患者の負担が軽減される、などの利点があり非常に有用である。また、少量の液状検体を希釈することにより、同一の検体から数枚の標本作製も可能である。

検体が1 ml以下の少量の場合は、シリンジで吸引せずに、フィルターの下に直接濾紙やティッシュペーパーを敷き、フィルター上に検体を滴下すると、水分のみが紙に吸収され、検体の無駄がない。前房水などはこの方法が簡便で有用である。具体的には、約0.1 mlの前房水の半量を細菌培養検査に提出し、残りの約50 μ lを用いて本法により細胞診標本作製することが可能である。

本メンブランフィルターは、厚さ10 μ mのポリカーボネートの膜で、直径5 μ mの穴(pore)が、約5~10%の開孔率であっているものである。フィルターは専用のスライドガラスに封入することにより、このporeはほとんど観察されなくなる。なお、このフィルターは従来から化学走化性の研究(chemotactic assay)に用いられているものと同一素材である¹¹⁾。

本フィルター標本において、時に細胞の核内のフィ

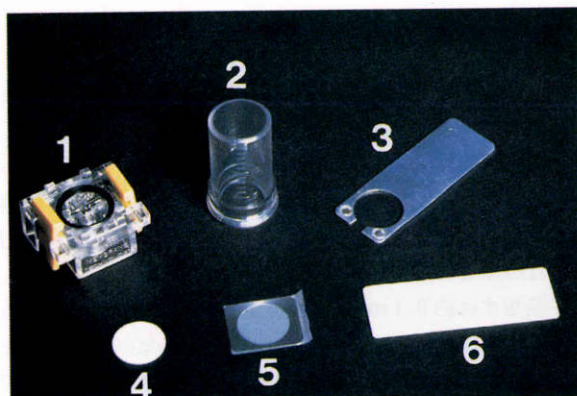


図1a メンブランフィルター (PORETEC®) キット.

1: ベースホルダー, 2: 円筒キャップ, 3: 磁石式取り出し器具, 4: スペース, 5: メンブランフィルター, 6: 専用スライドガラス

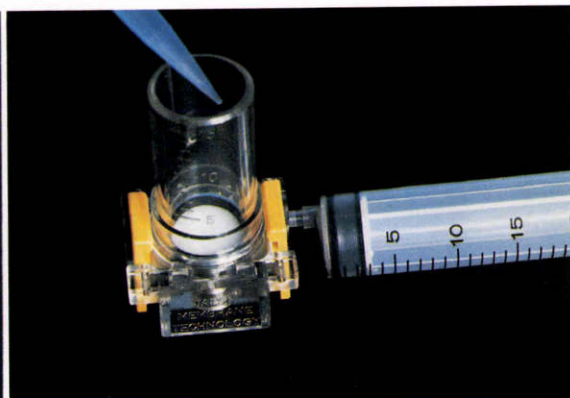


図1b 検体の吸引濾過塗抹.

円筒キャップの上から検体を注入, シリンジでゆっくりと吸引.

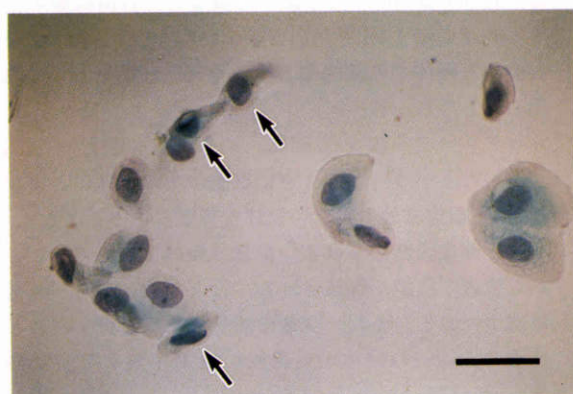


図2a 結膜上皮細胞オートスミア標本.

一部に細胞の辺縁がめくれあがるような変形した細胞(矢印)が認められる.

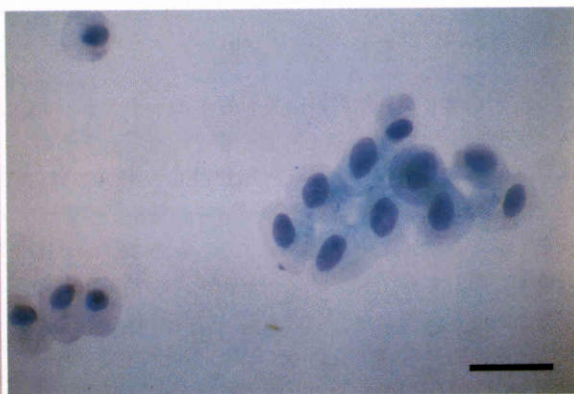


図2b 結膜上皮細胞メンブランフィルター標本.

類円形の核をもつ胞体の豊かな結膜上皮細胞が観察される(図2a, bはともにババニコロウ染色, バーは20 μm).

ルターの pore に一致すると思われる部分がヘマトキシリンに濃染するアーチファクトが生じることがある. 細胞が柔らかいためと考えられるが, このような場合, 検体に同量の液状検体用固定液(粘液溶解剤を含まないもの, 武藤化学薬品, 東京)や50% エタノール+ポリエチレングリコール溶液などを加え, 約1分間前固定してから, 通常通りフィルター標本を作製するとよい.

ところで, 本フィルターを用いて免疫染色も可能である. 免疫染色の方法はほぼ通常通りであるが, 一次抗体や二次抗体の反応は次のように行っている. 一次抗体ならびに二次抗体は40~50 μl をアクリル板やバ

ラフィン板もしくはプレートステイン®(松浪ガラス工業, 東京)の上に滴下しておき, その上に気泡が入らないようにメンブランフィルターをのせる. さらにその上に, 抗体の乾燥を防止する目的で, 家庭用のラップフィルムで覆い湿箱で反応させている. 近年, 種々のモノクローナル抗体やポリクローナル抗体が市販されており, これらを用いた免疫染色を併用することにより, 細胞の特徴を明らかにし, 種々の眼疾患の病態のより深い理解が可能であると思われる^{12)~15)}.

新しいメンブランフィルターを用いることにより, 少量の液状検体から, 簡便にかつ高い集細胞数で良好

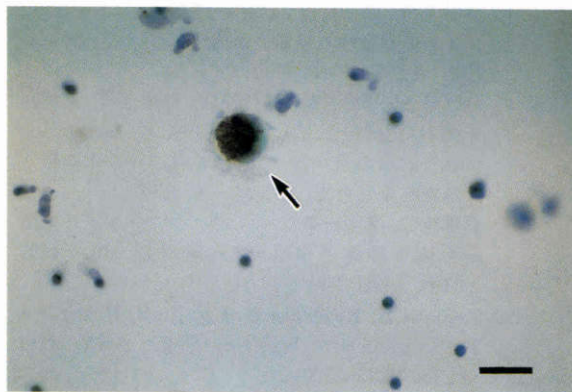


図3 原因不明のぶどう膜炎症例(71歳女性)の前房水標本。

多数のリンパ球と少数のマクロファージ(一部はメラニン色素を貪食:矢印)が観察される。(パパニコロウ染色, バーは20 μ m)

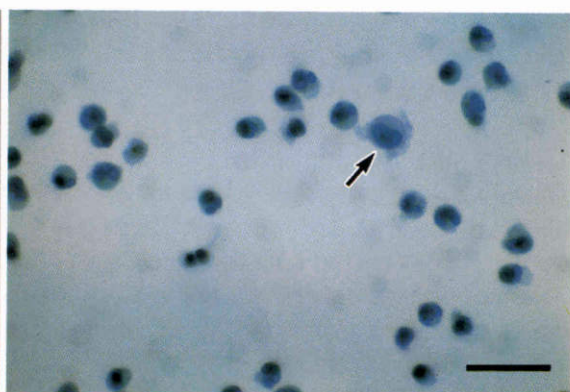


図4 原因不明のぶどう膜炎症例(69歳男性)の前房水標本。

多数の好中球と少量のマクロファージ(矢印), リンパ球が観察される。(パパニコロウ染色, バーは20 μ m)

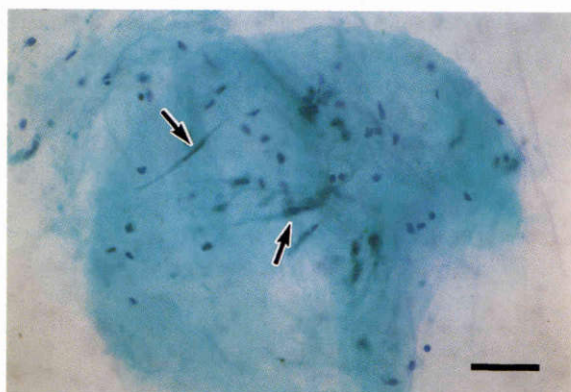


図5 増殖糖尿病網膜症(52歳男性)の硝子体切除標本。

硝子体塊の中に著しく長い紡錘形の細胞(矢印)と類円形の核を持つ細胞が観察される。(パパニコロウ染色, バーは40 μ m)

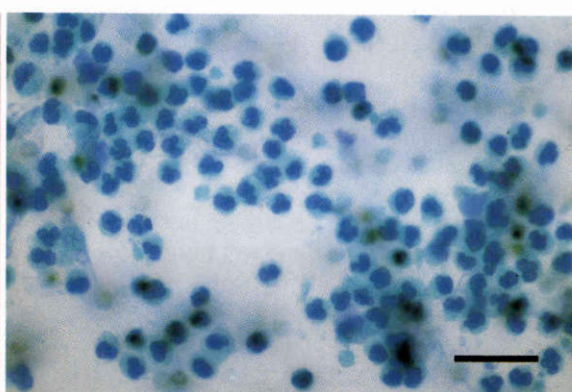


図6 眼内レンズ術後の眼内炎症例(70歳男性)の硝子体切除標本。

多数の好中球が観察される。(パパニコロウ染色, バーは20 μ m)

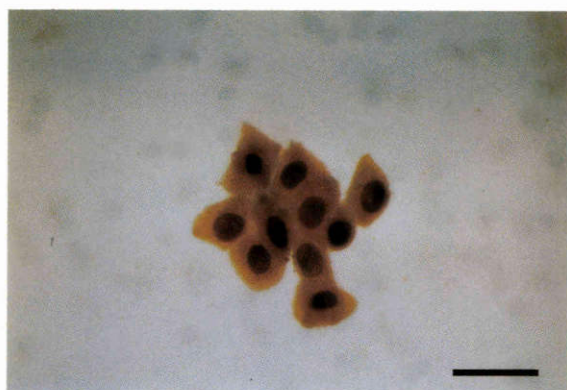


図7 結膜上皮細胞に対し, 抗ケラチンモノクローナル抗体(AE1)を用いて酵素抗体法を施行した標本。細胞質内に茶褐色の陽性像を示す。(バーは20 μ m)

な細胞診標本を得ることができた。今後、日常の眼科臨床における診断・治療、さらには研究などに広く応用可能であると考えられた。

稿を終えるにあたり、貴重な御助言を頂きました東京女子医科大学眼科学教室高野博子先生、北里大学病理学教室桑尾定仁先生に感謝致します。本論文の要旨は、第17回角膜カンファランス・第9回日本角膜移植学会にて講演した。

本研究の一部は文部省科学研究費一般研究(B) 03454418の助成を受けた。

文 献

- 1) 矢谷隆一, 坂本穆彦: 標本作製の実際とその理論的背景. 矢谷隆一, 他(編): 細胞診を学ぶ人のために. 医学書院, 東京, 45-67, 1990.
- 2) Engel H, de la Cruz ZC, Jimenez-Abalahin LD, Green WR, Michels RG: Cytopreparatory technique for eye fluid specimens obtained by vitrectomy. *Acta Cytol* 26: 551-560, 1982.
- 3) Green WR: Diagnostic cytopathology of ocular fluid specimens. *Ophthalmology* 91: 726-749, 1984.
- 4) Glasgow BJ, Foos RY: Methods in ocular cytology. In: Glasgow BJ, et al (Eds): *Ocular cytopathology*. Butterworth-Heinemann, Boston, 1-8, 1993.
- 5) 小林忠男, 植田正己, 西野俊博, 山木垂水, 榎木勇: 自動細胞収集装置の細胞収集率向上の検討. *日臨細胞誌* 30: 703-709, 1991.
- 6) 古田則行, 平田守男: 癌研式簡易集細胞塗抹法(ヌクレポアフィルター)の考案とその有用性について. 第38回日本臨床病理学会総会抄録集, 341, 1991.
- 7) 平田守男, 古田則行: PORETEC法(フィルター)による液状検体の集細胞塗抹標本作製法. 検査と技術 19: 621-626, 1991.
- 8) 朝隈蓉子, 千野秀教, 野村利之, 舟橋信司, 家村和千代, 伊円真紀子, 他: PORETEC法(Membrane filter)による液状検体の集細胞法とその細胞像. *日臨細胞東京会報* 10: 28-30, 1992.
- 9) 桑尾定仁, 菊池一寿: メンブレン・フィルターを用いた固形腫瘍の細胞診. *臨床検査* 36: 1183-1184, 1992.
- 10) Tsubota K, Kajiwara K, Ugajin S, Hasegawa T: Conjunctival brush cytology. *Acta Cytol* 34: 233-235, 1990.
- 11) Gauss-Muller V, Kleinman HK, Martin GR, Schiffmann E: Role of the attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. *J Lab Clin Med* 96: 1071-1080, 1980.
- 12) 金子行子: 日常臨床での塗抹標本. *眼科* 33: 1127-1131, 1991.
- 13) Kobayashi T, Mizuhara S, Arai M, Sawaragi I: Application of immunoperoxidase staining in the cytodagnosis of herpes simplex keratitis. *Diagn Cytopathol* 1: 317-321, 1985.
- 14) Baudouin C, Haouat N, Brignole F, Bayle J, Gastaud P: Immunopathological findings in conjunctival cells using immunofluorescence staining of impression cytology specimens. *Br J Ophthalmol* 76: 545-549, 1992.
- 15) Davis JL, Solomon D, Nussenblatt RB, Palestine AG, Chan C-C: Immunocytochemical staining of vitreous cells. Indications, techniques, and results. *Ophthalmology* 99: 250-256, 1992.