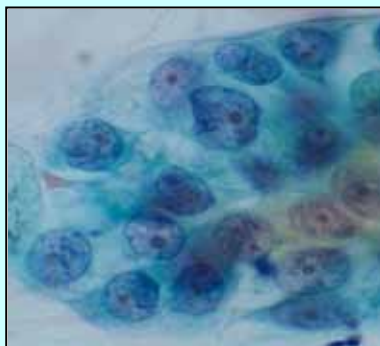
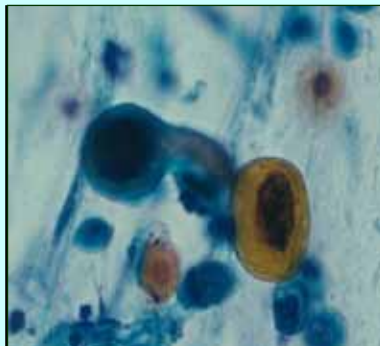
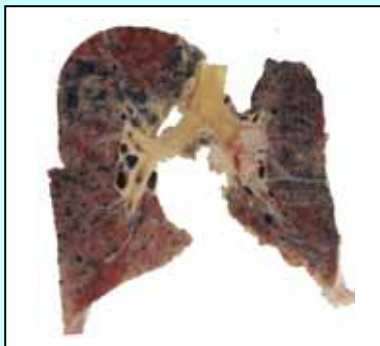


# 細胞診標本作製マニュアル

## 呼吸器



細胞検査士会(編)

Methods in  
Pulmonary Cytology





# 目次

## ・喀痰の塗抹・処理

- (1) 新鮮喀痰 ..... 1
- (2) 粘液融解法による保存痰 ..... 2
- (3) ポストチューブ法による保存痰 ..... 2

## ・病巣直接採取材料の塗抹・処理

- (1) 気管支擦過 ..... 3
- (2) 肺穿刺吸引 ..... 4
  - \* 付説 再水和法 ..... 4,5
- (3) 擦過・穿刺器具の洗浄液 ..... 5
- (4) 気管支・肺胞洗浄液 ..... 6

## ・集検喀痰細胞診のための標準染色法 ..... 7

### 呼吸器細胞診標本作製マニュアル

#### 1. 目的

喀痰(新鮮痰及び保存痰)、気管支擦過、肺穿刺吸引、擦過・穿刺器具洗浄液、気管支洗浄液などの呼吸器細胞診の標本作製に関して、従来行われている標本作製法の長所と短所を明らかにし、新しく日常検査に応用可能な方法の開発や、さらに詳細な留意点を検討し、初心者でも良好な標本作製を可能とすることを目的とした。

## ．喀痰の塗抹・処理

### ( 1 ) 新鮮喀痰

#### 1 . 検体容器

検体は性状観察がしやすいように透明の容器で提出してもらうことが望ましい。

#### 2 . 性状観察

透明容器は濃い背景下で観察する。白色系不透明容器は、透明シャーレなどに移して濃い背景下でよく観察を行う(図1)。

#### 3 . サンプルング

ピンセット(ルツェ型、俗称耳鼻科用が使用しやすい)、スライドガラスの縁などを使って行う。採取部位は、血痰部を認める場合はその部を優先し、血痰部を認めない検体では粘液性～粘稠性を優先し、さらに他の性状部からもサンプルングする(図2)。ピンセットは検体の数だけ用意し、使用後消毒液に浸漬する。

#### \* 採取優先部位

1) 血痰部を認める場合はその部を最優先する。ただし、血液成分とその境界部分を採取する。

2) 血痰でない場合：粘液性～粘稠性を優先し、透明無色部～透明様淡白色部(片栗粉状)、透明様黄白色部～黄白色部、黄色膿性、その他の順で採取する。

#### 4 . 塗抹, 固定

小豆～大豆大の喀痰を片方のスライドガラスに載せ、3cm程度に細く伸ばし、もう1枚のスライドガラスで挟んで圧力をかけ、喀痰を伸展する。量が多くはみ出たときは紙で拭き取る。前後または左右に引き離し、直ちに固定する。すり合わせ回数が多いほど細胞破壊や核線が生じるため3回以内が望ましい(図3)。塗抹面は45～50mmの範囲に収まるようにする。

#### 5 . 検体採取から塗抹固定までの時間

検体採取後、可及的速やかに塗抹固定処理することを原則とする。ただし、室温で5時間、冷蔵庫で48時間以内は検査を試みる。

#### 6 . 感染防止対策

安全キャビネット内で行うことが望ましいが、無い場合でも結核菌対策用マスクを装着して検体を取り扱うことが望ましい。



図1 喀痰は濃い色の背景で観察する



図2 ピンセットによるサンプルング

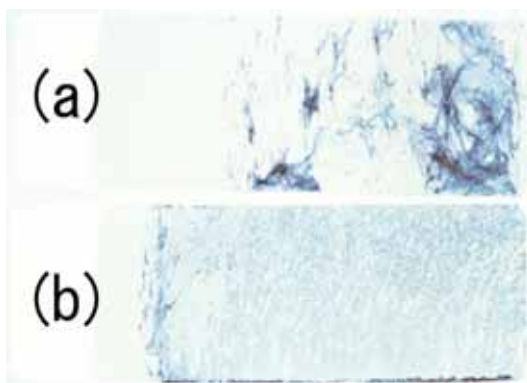


図3 (a) すり合わせ3回 (b) すり合わせ10回以上



## (2) 粘液融解法による保存痰

早朝痰を保存液中に3日分蓄痰する。採取する際に重要なことは、痰を入れる度によく振るように説明する（標本作製時に粘液が融解されている）。粘液融解の不十分な場合は融解剤を追加後、充分混和し一晩室温で放置し、完全に粘液を融解させる。

スライドガラスはコーティングガラスを使用し、塗抹面は25mm×45～50mmとする。

### 1. 塗抹, 固定

1) 容器のまま1,500rpm/5min遠心する。  
2) 上清を捨て、水分を良く切る。  
3) 沈渣液はブレンダーで十分に攪拌し、亜硫酸混濁試験（ZTT）標準液の50倍濃度液の濃さを目安に保存液で調整する。（図4）

4) ピペットで0.1mlをスライドガラス面に線を引くように乗せる。

5) もう一枚のスライドガラスを重ね、沈渣が塗抹面全体にいきわたったら、均等になるように軽く前後に動かした後、前後または左右にゆっくりと引き離す。（図5）

6) 一晩自然乾燥させる。

7) 95%アルコールで10分以上固定後、通常のパパニコロウ染色を行う。

### 2. 標本の目安

塗抹面の厚さを一定にする。【新聞紙の上においてかるうじて字が読み取れる位の厚さ（図6）400倍で1視野中の上皮細胞は90個程度が望ましい。】

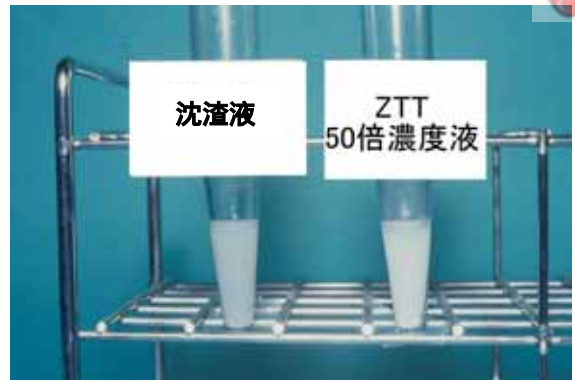


図4 沈渣液



図5 沈渣液（0.1ml）

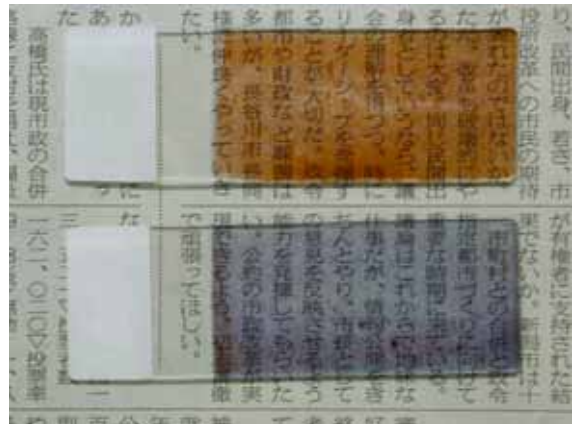


図6 すり合わせ塗抹染色後標本

## (3) ポストチューブ法による保存痰

輸送、取り扱いが便利であるが、細胞がスライドガラスから剥離しやすい、また細胞変性が強い欠点もある。

### 1. 塗抹, 固定, 染色

ポストチューブ付属の濾紙に喀痰をだして性状の異なる4～5ヶ所より、ピンセットを用いて豆粒より少し大きめの喀痰をスライドガラス上に採取する。2枚のスライドガラスで喀痰を押し広げ、均等になるように上下左右3～4回擦り合わせ塗抹する。直ちに固定液に入れると、塗抹面が剥離するため乾燥後、95%アルコールで10分以上再固定後、染色する。

## II. 病巣直接採取材料の塗抹・処理

感染防止のためにゴム手袋，結核菌対策用マスク等を着用する。  
塗抹後，絶対乾燥させずに固定液（95%エチルアルコール）に入れる。コンタミネーションを防ぐために，極端に厚い塗抹をしない。患者の負担が大きい検査であるため，採取された検体の塗抹処理はより慎重に，かつ手早く行なうことが大切。

### （１）気管支擦過

細胞採取器具にはブラシ（図7）とキュレット（鋭匙）がある。

#### 1. ブラシの場合

ファイバースコープから取り出されたブラシをすばやく付け根の部分を持って塗抹する。3種類の方法があるが塗抹しやすい方法を用いる（図8～11）。ブラシをスライドガラス面に強く押しつけない。

1) スライドガラス面にブラシを軽く押し付ける方法で，ブラシは縦塗り（図8）でも，横塗り（図9）でもかまわない。

2) ブラシの毛の部分が高い場合は，スライドガラス2枚ではさむように軽く押しつけて塗抹する（図10）。

3) ブラシの付け根を持って，ブラシ部分をムチでたたきつけるようにはじいてスライドガラスへ材料を落として塗抹する（図11）。

#### 2. キュレット（鋭匙）の場合

キュレットの付け根の部分を持ち，キュレットの中の材料をスライドガラス上にたたきつけるようにして出し（もう1枚のスライドガラスではずみをつけるとやりやすい 図12），直ちに軽くすり合わせて塗抹する。

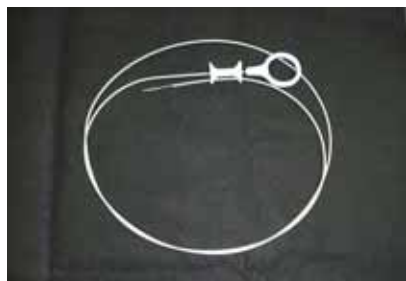


図7 気管支鏡の中に挿入するブラシ



図8 矢印方向へ縦に塗抹



図9 矢印方向へ横に塗抹

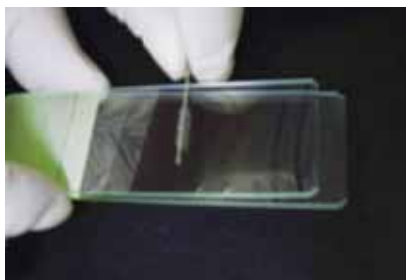


図10 スライドではさむように塗抹



図11 ムチでたたきつけるように塗抹



図12 キュレット(鋭匙)の塗抹



## (2) 肺穿刺吸引材料

X線透視下やCTガイド下あるいは気管支鏡下で、病巣から穿刺針にて吸引された材料を塗抹、固定し、染色する(図13,14)。

### 1. 塗抹, 固定

穿刺針の内容物をスライドガラス上に静かに噴き出し、穿刺針の先で薄く延ばすように塗抹し(または、2枚のスライドガラスで軽くすり合わせ塗抹してもよい。1枚はギムザ染色用として素早く風乾してもよい)、乾燥させずに直ちに固定液に入れる。血液成分や液状成分が採取された場合は、すり合わせ塗抹後、スプレー固定(コーティング固定)をする。スプレー固定せずにアルコール固定液に入れると細胞がスライドガラスから剥脱してしまう場合が多い。採取量が少ない場合は塗抹後、乾燥しやすいので特に注意する。内容物を噴き出した後の穿刺針は、洗浄液(サコマノ液、Hanks液やTC-109などの組織培養液)で洗い、遠心法、オートスミア法、フィルター法などで塗抹する。

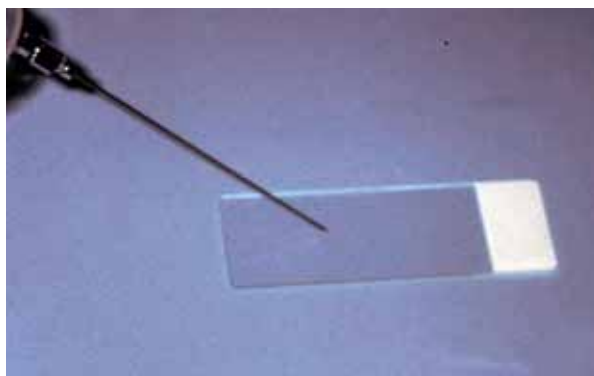


図13 肺穿刺吸引材料の塗抹

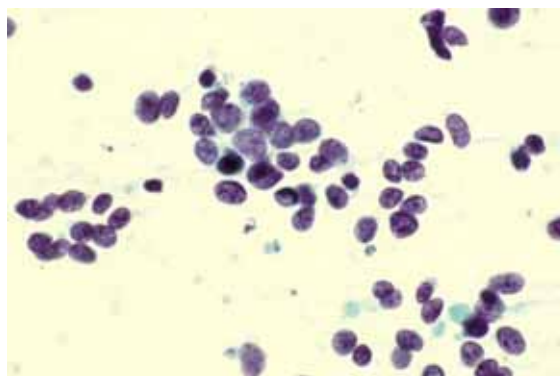


図14 肺の腫瘍穿刺で得られた小細胞癌細胞(400倍)

---

## \* 付説 再水和法

固定前に乾燥した場合は、再水和処理した後に固定すると、細胞質および核の染色性が良好になって判定しやすくなる。ただし、**乾燥後アルコール固定した標本では、再水和処理を行っても染色性の改善は望めない**。塗抹後乾燥してから再水和処理を施す時間が早いほど、良好な染色性が得られる。遅くとも2日以内に再水和処理を行う(図15~18)。なお、細胞成分が非常に少ない標本では効果が少ない。

### 再水和法

- 1) 未固定で乾燥した標本の上に生理食塩水、または血清を満載し30秒~5分間おく。
- 2) 軽く水洗した後、95%アルコールで30分以上固定し、染色する。

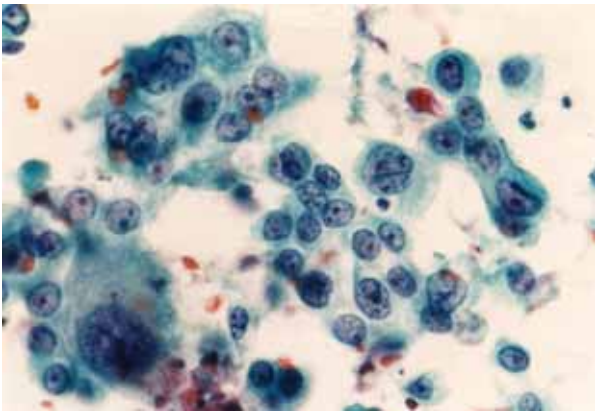


図15 塗抹後，直ちにアルコール固定

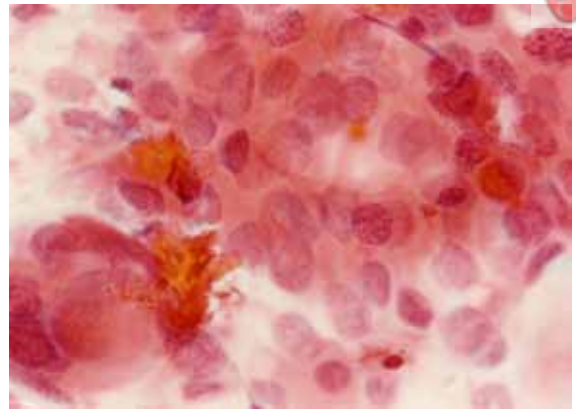


図16 2日間乾燥後アルコール固定(未処理)

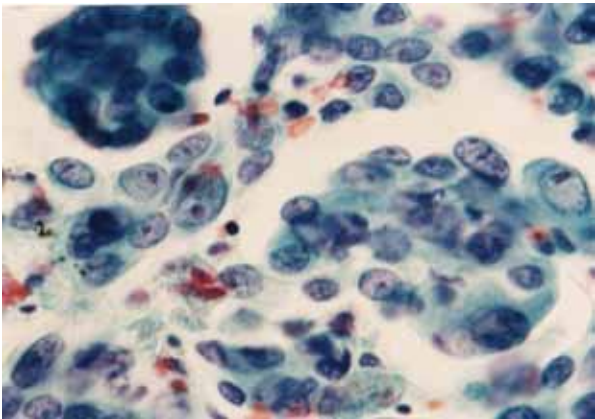


図17 2日間乾燥，再水和処理

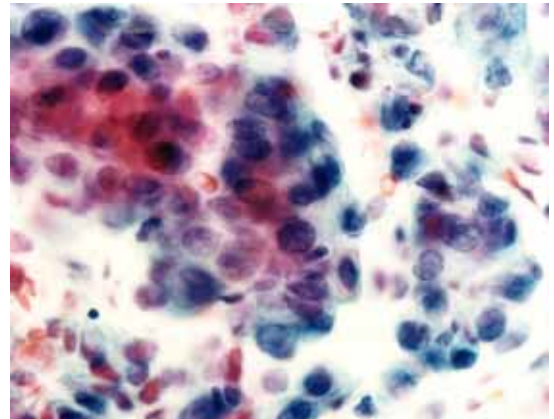


図18 3日間乾燥，再水和処理

### (3) 擦過・穿刺器具の洗浄液

擦過および穿刺器具を洗浄する場合は，低濃度アルコールとポリエチレングリコールを含む細胞保存液で洗浄した後（5日以内），集細胞を行い再固定を施すと良好な細胞標本が得られる。また，ギムザ染色を併用するときは，3%アルブミン添加緩衝食塩水にて洗浄すると良好な標本が得られるが，このよう場合は3時間以内に検体処理をする。なお，生理食塩水による洗浄は時間の経過とともに核が膨化，変性するため避けた方がよい（図19，20）。

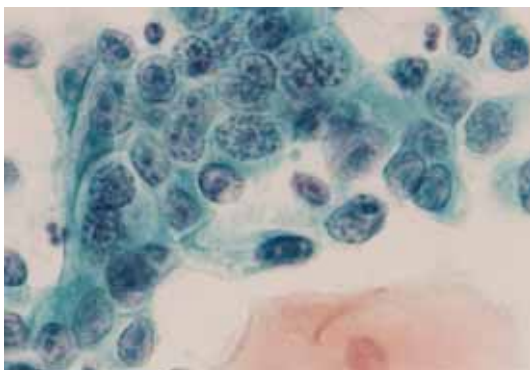


図19 生理食塩水洗浄直後塗抹固定

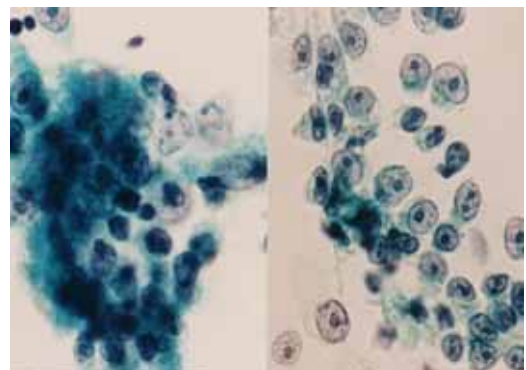


図20 生理食塩水洗浄  
a: 1時間後塗抹固定    b: 3時間後塗抹固定



## (4) 気管支・肺胞洗浄液

### 1. 検体の性状観察

気管支・肺胞洗浄液は粘液の泡沫状部分が最上層に残るので、粘液融解剤を添加する。粘液融解剤を添加するかわりに、高速ブレンダー - 処理をしても良い。血性検体には溶血剤を添加する(図21)。そのまま遠心して最上層の泡沫部分をピペットで吸引し、スライドガラス2枚で擦り合わせ塗抹すると変性の少ない細胞が得られる。残りは粘液融解処理をすると良い。また、気管支・肺胞洗浄は剥離しやすいため、シランなどの剥離防止剤をコーティングしたスライドガラスに塗抹し、コーティング固定することが望ましい。

#### \* 粘液融解法

気管支・肺胞洗浄液に粘液融解剤を等量以上添加後、充分に転倒混和し、1~5分後、遠心し沈渣を擦り合わせ塗抹する。粘液融解剤を添加するかわりに、高速ブレンダー - 処理を行っても良い。粘液融解剤は、Dithio-threitol (SIGMA) を用いた場合、100mlの生理食塩水に対し、小さじ1杯の割合に加える。その他市販の粘液融解剤も使用可能である。

#### \* 溶血法

血性検体には溶血剤を付加する。洗浄液に溶血剤を直接等量混和し、溶血するのを待つ、溶血しない時には、遠心して上清を捨てて溶血操作を繰り返す。溶血したら粘液融解剤を添加し、同様に遠心後塗抹する。溶血剤には1) 0.9% 塩化アンモニウム, 2) 1.4% シュウ酸アンモニウム, 3) サポニンなどがある。1) は時間がかかるが核の変性が少ない, 2) は溶血時間は中間的で細胞質の変性, 核の変性が強い, 3) 適切な量では細胞質の変化や核の変形が少ないなどの特徴がある。

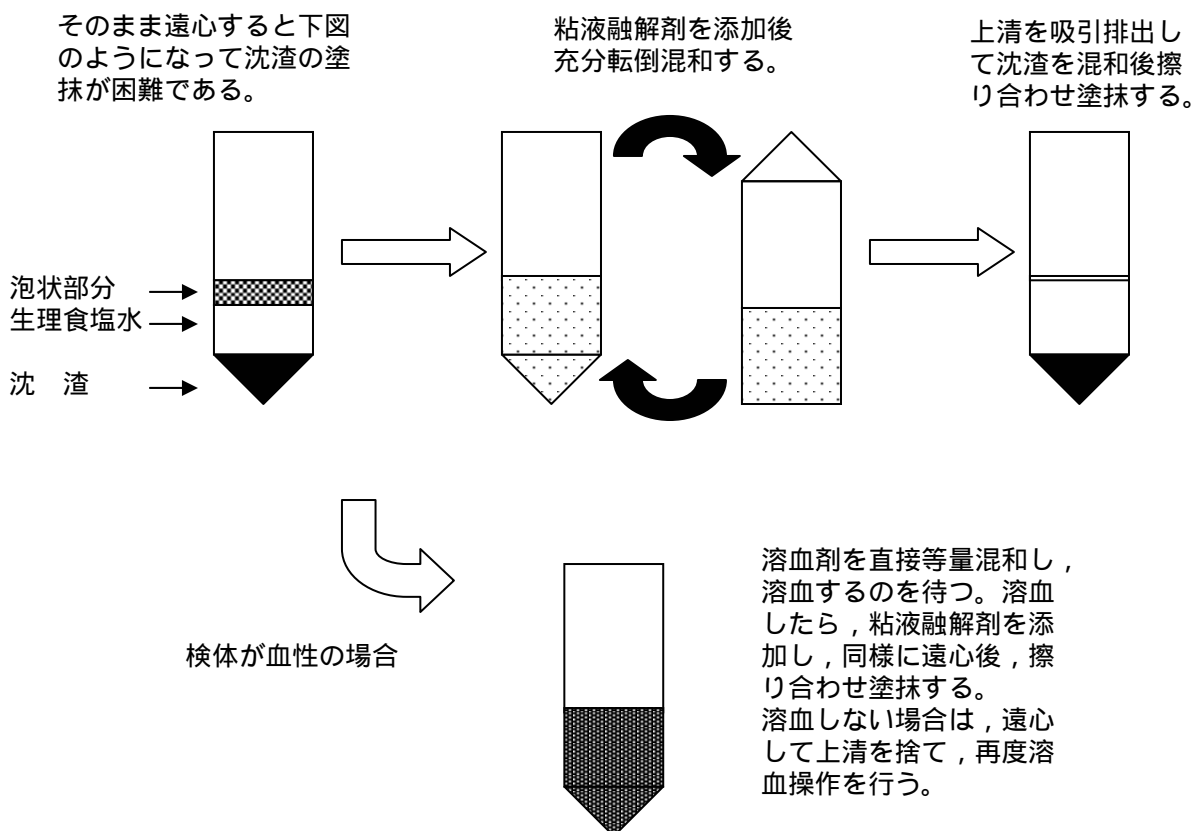


図21 粘液融解法および溶血法





## ．集検喀痰細胞診のための標準染色法（保存痰用）

パパニコロウ染色は細胞診の基本的な染色法であるがその染色系列や時間は施設により千差万別で検鏡者の好みや見慣れた色調を優先している。しかし、早期肺扁平上皮癌の判定には、細胞質の光輝性、濃染度が重要であるため、全国的に統一した染色法で論じられるべきであり、標本作製標準化委員会では保存痰に適した染色手技を検討し下記の結論をえた。

1. 核染の分別を1%より薄い塩酸70%アルコールでやや長めに行った方がよい。  
(0.5%塩酸70%アルコール:20~30秒または0.3%塩酸70%アルコール:40~60秒)
2. OG液とEA液の間に1% 酢酸・燐タンゲステン酸アルコールを使用すると、細胞質の光輝性が強まり背景もきれいになる。

### パパニコロウ染色標準法(保存痰用)

固定液	OG - 6 (2分)
下降アルコール系列	95%アルコール 2槽 (各10~12回上下)
水洗(10~20回上下)	1%酢酸・燐タンゲステン酸 95%アルコール(10~12回上下)
ギルヘマトキシリン(2分)	95%アルコール 2槽 (各 10~12回上下)
水洗(10~12回上下)	EA - 50 (3分)
0.5%塩酸70%アルコール(20~30秒)	95%アルコール 2槽 (各 10~12回上下)
流水 10分(色出し)	100%アルコール 4槽 キシロール 4槽 (各槽5分)
上昇アルコール系列	95%アルコール (各10~12回上下)
95%アルコール (各10~12回上下)	封入

注) 染色機では10~12回上下を15~20秒に設定する。

### 染色の留意事項

1. 保存痰の場合、塗抹乾燥後95%アルコ - ル10分以上再固定が必要。
2. 塗抹から染色までの日数は2日以内がよい。
3. 染色液の交換は800~1000枚以内に行なう(500mlバット使用の場合)。
4. 染色液の交換は、古い液を半分残し半分新しい液を足す方法を頻繁に行なうことで常に一定な染め上りが保てる。
5. モレキュラ - シ - プ使用のキシロ - ルで透徹を充分する。



## 参考文献

- 1) 畠山重春, 島崎明子, 戸谷恵美子, 加賀谷 晃: 喀痰細胞診の成績と塗抹法について, 衛生検査 33:1580 ~ 1584, 1984
- 2) 畠山重春, 川名展弘, 松元照美: 【病理組織・細胞診実践マニュアル】検体の受付と処理検査と技術 26巻7号:190 ~ 195, 1998
- 3) 古田則行, 都竹正文: 正しい細胞診標本作製法. 病理と臨床 20:17 ~ 24, 2002
- 4) 西 国広. -基礎から学ぶ-細胞診のすすめ方. 近代出版 75 ~ 78, 2001
- 5) 上野喜三郎, 斉藤 豊, 久保山明子, 大塚重則, 田中 昇: 喀痰細胞診における私の工夫-検体処理と標本作製, 日臨細胞誌東京都支部会会報 13:21 ~ 24, 1995
- 6) 原田弥生, 山岸克博, 牛島友則: 【病理組織・細胞診のための - 日常染色法ガイダンス - 】細胞診の日常染色法 - パパニコロウ染色 -, 検査と技術増刊号 29巻7号:934 ~ 936, 2001
- 7) 近 京子, 中嶋隆太郎, 小野寺美枝, 白鳥まゆみ, 佐藤博俊 ほか: 早期肺扁平上皮癌のスクリーニングと判定における細胞質染色性の光輝性の意義と染色法の検討, 日本臨床細胞学会雑誌 38:15 ~ 22, 1999
- 8) 佐藤雅美, 斎藤泰紀, 鈴木隆一郎, ほか: 喀痰細胞診を用いた肺癌検診の精度管理の成績, 日本臨床細胞学会雑誌 36巻6号:568 ~ 575, 1997

日本臨床細胞学会細胞検査士会標本作製標準化委員会:呼吸器部会

若木純子(富山県健康増進センター)

南雲サチ子(大阪府立成人病センター)

土屋正和(東京都予防医学協会)

検討協力者

赤松 節(二市北蒲原郡総合健康開発センター)

富銘良也(国立病院東京医療センター)

細野芳美(大阪府立羽曳野病院)

渡辺芳明(新潟県立がんセンター新潟病院)

学術編集担当者

伊藤 仁, 神原 豊, 武智昭和, 都竹正文, 西 国広, 三宅康之, 山岸紀美江

協力施設(順不同)

北海道対がん協会細胞診センター:福島県保健衛生協会:千葉県対がん協会:群馬県健康づくり財団:石川県成人病予防センター:岡山県健康づくり財団:鳥取保健事業団:香川県総合健診協会:結核予防会福岡支部:熊本県成人病予防協会:厚生連高岡病院:富山県医師会健康管理センター:富山労災病院:富山医科薬科大学附属病院:富山赤十字病院:社会保険高岡病院:氷見市民病院:市立砺波総合病院:富山市民病院:富山県立中央病院:宮城県対がん協会細胞診センター:仙台厚生病院:新潟県立がんセンター:二市北蒲原郡総合健康開発センター:日本ノーバメディカル研究所:富山県健康増進センター:大阪府立羽曳野病院

協力

武藤化学株式会社

## 細胞診標本作製マニュアル(呼吸器)

2003年5月1日発行 第1版第1刷

発行者 細胞検査士会

本書の内容を無断で複写・複製・転載すると、著作権・出版権の侵害となることがありますので御注意下さい。