

## ● 各施設一般演題 (4) : 耳鼻咽喉科 II-2

## 定量的鼻汁細胞診

李 華 植 間 島 雄 一 坂 倉 康 夫

## はじめに

鼻汁細胞診は、1927年 Eyer mann<sup>1)</sup> が鼻汁中各種細胞の重要性を言及して以来、鼻・副鼻腔疾患の診断や治療方針の決定、経過観察などにおいて重要な指標の一つである<sup>2)</sup>。しかし、過去に報告されている鼻汁細胞診は主に定性的ないし判定的細胞診であった。鼻汁は喀痰と同様粘弾性を有しているので<sup>3)</sup>、定量的細胞診は必ずしも容易ではない。そこで本研究では粘液の粘弾性を低下させる薬剤を鼻汁に加え、より鮮明で正確な定量的細胞診のできる可能性について検討した。

## 1 対象および方法

## 1) 使用薬剤

鼻汁は高い粘弾性を有する慢性副鼻腔炎患者粘膿性鼻汁を用いた。使用薬剤は dithiothreitol (DTT), ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt (EDTA), serratio peptidase (SP), propylene glycol (PG), urea および対照として Hanks 液 (Hanks' balanced salt solution) を用いた。

## 2) 最適薬剤濃度値の決定

鼻汁15例を3例ずつ5群に分け各薬剤の異なった濃度で鼻汁を処理し、最も細胞数の多い濃度をその薬剤の最適値として以下の検討に用いた。各薬剤の濃度は、①1, 10, 100, 250 mM DTT, ②1, 10, 100, 250 mM EDTA, ③0.001,

0.01, 0.1, 0.25% SP, ④0.01, 0.1, 1, 10% PG, ⑤1, 10, 100 mM, 1 M urea であった。

## 3) 薬剤処理と鼻汁中細胞数との関係

2) で測定した各薬剤の最適値薬剤濃度を用いて以下の検討を行った。鼻汁20例を10例ずつ二つに分け、まず10例をおのおの5等分し、HBSS 処理群, EDTA 処理群, PG 処理群, SP 処理群および urea 処理群とし、また他の10例はおのおの2等分し、HBSS 処理群および DTT 処理群とした。各群において鼻汁中細胞数の経時的変化、各処理時間において群間細胞数の比較、鼻汁中構成細胞の百分率、塗抹標本の粘液処理状態および染色性について比較検討した。

## 4) 定量的細胞診

Juhn Tym-Tap<sup>®</sup> を使用して鼻腔より直接吸引採取した鼻汁を各薬剤にて40~100倍希釈し、軽い用手振盪で完全に混和し、SP 処理群は37°C, その他の群は4°Cで、前項2) では1時間また3) では1, 3, 6時間放置した後 cytospin 2 (Shandon Southern 社) のサンプルチャンパー内に希釈鼻汁 30 $\mu$ l と Hanks 液 200 $\mu$ l を入れ、1200 rpm で10分間遠心塗抹し、冷風に10分間強制乾燥後 ライト・ギムザ染色を行い、1000倍率で20視野を検鏡した (Fig. 1)。Table 1 のように1視野当たりの平均細胞数、希釈倍率、希釈鼻汁の量、塗抹標本の直径、1000倍視野の直径から鼻汁 1 mm<sup>3</sup> 当たりの各細胞数を算定した。

**Key words:** Cytology, Nasal secretions, Dithiothreitol, Cyto centrifugation, Mucolytic agents, Chronic sinusitis

三重大学医学部耳鼻咽喉科

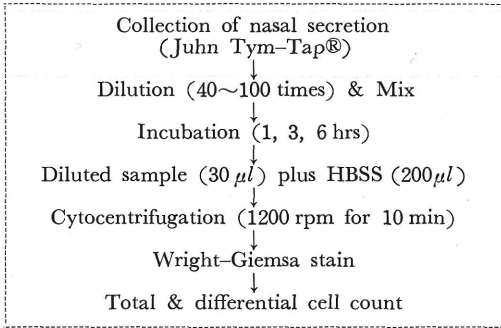


Fig. 1 Method

Table 1 Calculation of the number of cells per mm<sup>3</sup>

$$\text{Number of cells per cubic mm} = A \cdot B \cdot D^2 / C \cdot E^2 = 60.68 (A \cdot B)$$

- A: mean cell count per field (1000×)
- B: dilution factor for the sample
- C: amount of the diluted sample (30 μl)
- D: diameter of the sedimented area on the slide (6.4 mm)
- E: diameter of the oil immersion field (0.15 mm)

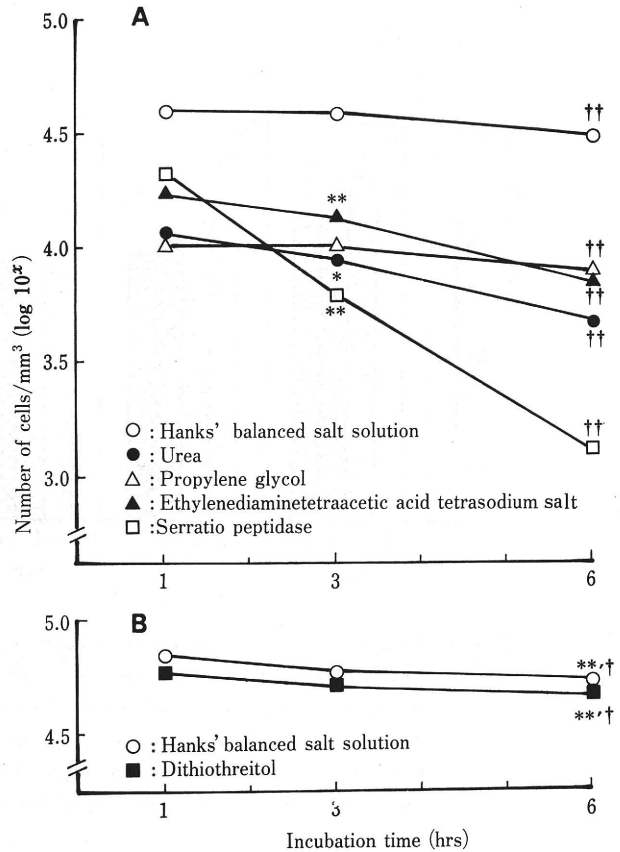
Table 2 Effect of various drug concentration on the total cell count of nasal secretion

Drug	Sample number	Total cell count per cu mm			
		(1 mM)	(10 mM)*	(100 mM)	(250 mM)
DTT	1	115171	128156	12617	10528
	2	24272	30340	24272	18227
	3	4126	8010	607	419
EDTA	4	5340	4126	364	607
	5	11530	13141	1214	485
	6	7767	19418	850	485
FG	7	169419	263108	143205	154612
	8	45874	52185	46117	46845
	9	11408	22816	10680	15777
SP	10	32282	73301	23301	16262
	11	16990	22573	3641	7282
	12	16990	21602	18204	16505
Urea	13	28156	26699	24272	11408
	14	58738	94418	80340	21845
	15	6311	8010	6553	2670

DTT: dithiothreitol, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt, PG: propylene glycol, SP: serratio peptidase

\* Most effective concentration of each drug

**Fig. 2** Changes of number of cells in mucopurulent nasal secretions as a function of incubation time (A,  $n=10$ ; B,  $n=10$ )  
 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , differences within each group in comparison with the value at 1 hour of incubation;  
 †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , differences within each group in comparison with the value at 3 hours of incubation.



## 5) 統計学的検討

鼻汁中細胞数の比較は対応のある Wilcoxon 検定で、鼻汁中各細胞の百分率の比較は対応のある  $\chi^2$  検定で行った。

## 2 結 果

### 1) 各薬剤の最適濃度値

各薬剤の異なった濃度による鼻汁中細胞数を比較した結果、DTT, EDTA, urea は 10 mM, SP は 0.01%, PG は 0.1% の場合が最も細胞数が多いことが明らかとなった (Table 2)。このためこれを最適濃度値とした。

### 2) 各薬剤群における鼻汁中細胞数の経時的変化

以下の検討は前項 1) で測定された各薬剤の最適濃度値を用いて検討した。HBSS, 0.1% PG 処理群では 1 時間の細胞数に比し 6 時間の細胞数が有意に低下したが、10 mM EDTA,

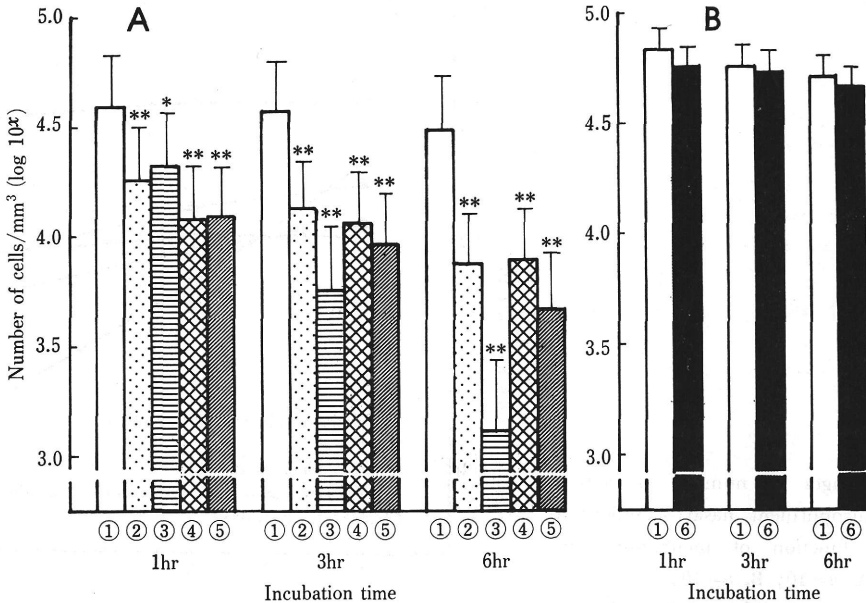
0.01% SP, 10 mM urea 処理群では 3 時間および 6 時間で 1 時間値に比し有意に細胞数が減少した (Fig. 2A)。一方、10 mM DTT 処理群と HBSS 処理群との比較では、両群同様 1, 3 時間の細胞数に有意の差は認められなかったが、6 時間の細胞数は 1 時間に比し有意に低下した (Fig. 2B)。

### 3) 薬剤処理 1, 3, 6 時間における薬剤群間の細胞数の比較

10 mM DTT 処理群と HBSS 処理群との間には各処理時間において細胞数の有意な差は認められなかったが (Fig. 3B), その他の群では HBSS 処理群に比べ各処理時間において各種の細胞数の有意な減少が認められた (Fig. 3A)。

### 4) 鼻汁中構成細胞の百分率の比較

各処理時間における HBSS 処理群と 10 mM DTT 処理群との間の構成細胞割合を比較する



**Fig. 3** Number of cells in mucopurulent nasal secretions at 1, 3, and 6 hours after treatment with drugs (A,  $n=10$ ; B,  $n=10$ )

① : Hanks' balanced salt solution, ② : ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt, ③ : serratio peptidase, ④ : propylene glycol, ⑤ : urea, ⑥ : dithiothreitol. Values are expressed as the mean  $\pm$  1 SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from the value for HBSS-treated group.

と、慢性副鼻腔炎鼻汁の大部分を占めている好中球をはじめとして大部分の構成細胞で有意な差は認められなかった (Fig. 4)。

5) 塗抹標本の粘液処理状態と染色性の比較

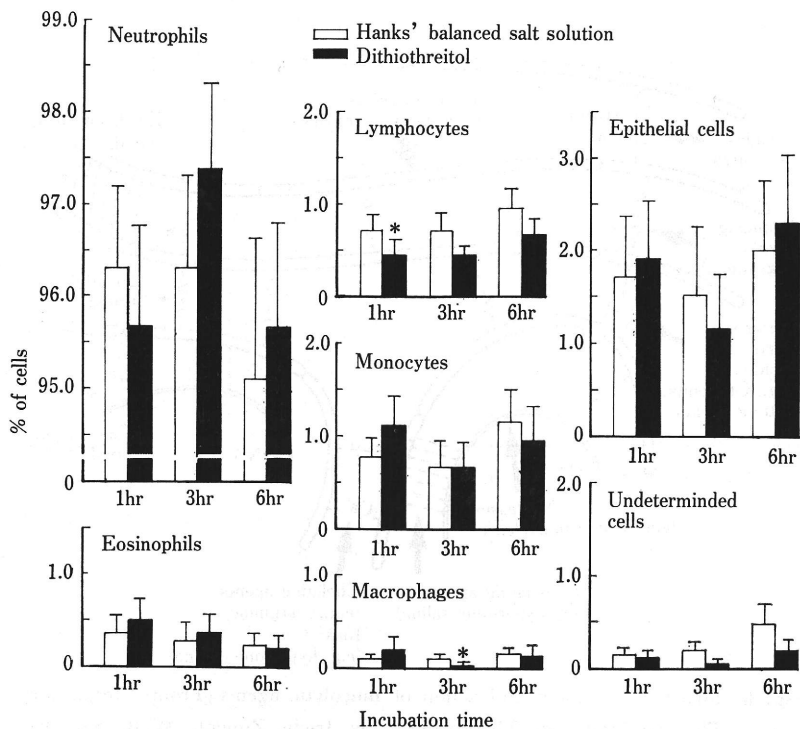
Fig. 5 は HBSS 処理群と 10 mM DTT 処理群の塗抹標本を示す。粘膿性鼻汁の粘液処理では 10 mM DTT 処理群と 0.01% SP 処理群が良好であったが、他群では粘液の処理が不十分で均一な標本を作製しにくく細胞の同定が困難な場合が存在した。一方、SP 処理群ではしばしば細菌の著明な増殖のため細胞の形態学的判定も容易でないことが多かった。結果的に DTT 処理群では均一で観察しやすい標本を作製することが可能であった。

3 考 察

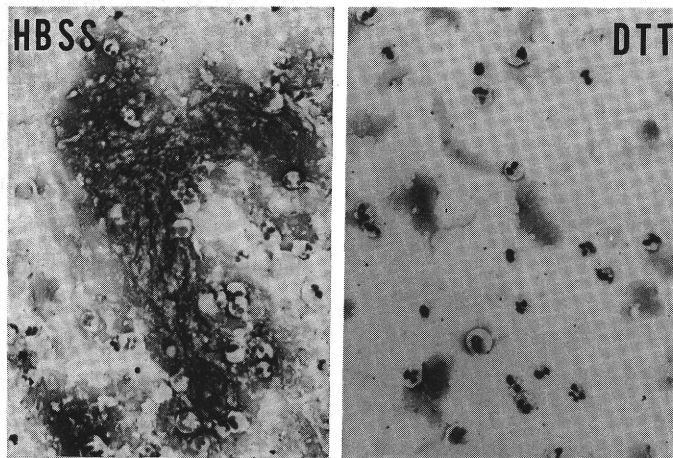
定量的細胞診は構成細胞の数を知ることがで

き、このため個体間の細胞数の比較をすることができただけでなく正確な構成細胞比を得ることができる<sup>4,5)</sup>といわれている。喀痰<sup>6)</sup>および中耳貯留液<sup>4,7)</sup>についての定量的細胞診は過去に報告されているが、鼻汁については本研究以外に報告をみていない。

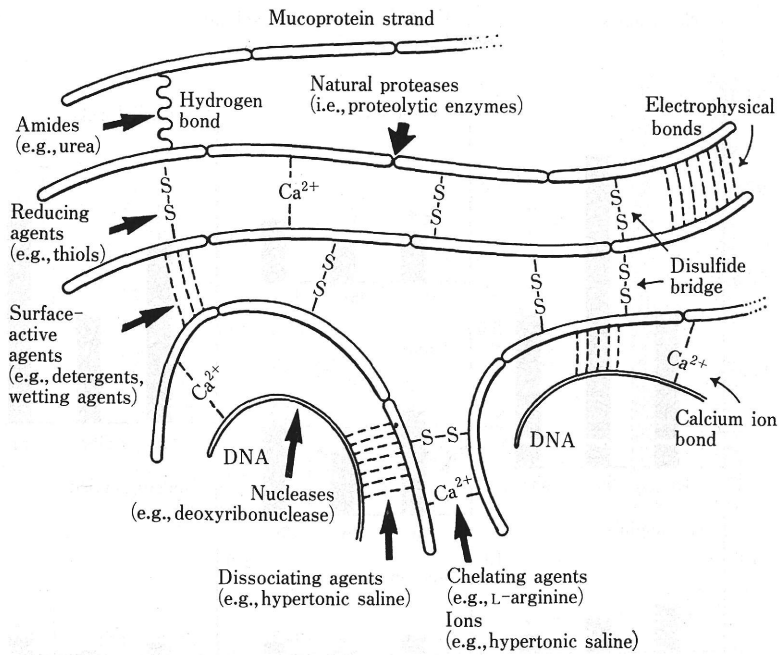
鼻汁は喀痰と同様に高い粘弾性的性質、不均一性が特徴であり<sup>3)</sup>、塗抹細胞分画の同定には多くの困難が存在する。Fig. 6 は気道粘液の構成と薬剤の作用機序を示したものである<sup>8)</sup>。鼻汁を含めた気道粘液の粘液成分の主体は、高分子の長い主鎖蛋白に短い側鎖が結合して構成されている。主鎖の蛋白間には S-S 結合、側鎖には糖-糖結合、そして種々のイオン結合(水素イオン結合、カルシウムイオン結合など)が分子間、分子内で形成され、高分子性の網状構成物が形成される<sup>9)</sup>。この高分子糖蛋白の網状構



**Fig. 4** Percent of each cell in mucopurulent nasal secretions at 1, 3, and 6 hours after treatment with drugs ( $n=10$ )  
 Values are expressed as the mean  $\pm$  1 SEM. \*  $p < 0.05$ , significantly different from the value for HBSS-treated group.



**Fig. 5** Photomicrographs of smear of mucopurulent nasal secretion from patient with chronic sinusitis. HBSS: Mass of mucus strands is seen in Hanks' balanced salt solution-treated group. DTT: Many neutrophils are seen, with a few mucus strands in the background. (Wright-Giemsa  $\times 400$ )



**Fig. 6** Structure of mucus and action of mucolytic agents (From "Respiratory Pharmacology and Therapeutics" by Irwin Ziment, W.B. Saunders Company, 1978).

造が気道粘液の粘弾性的性質の原因であるといわれている<sup>10)</sup>。今回使用した薬剤中チオール製剤である DTT は糖蛋白間の S-S 結合を開裂し、キレート製剤である EDTA はカルシウムイオンをキレート化することにより、PG や urea は水素イオン結合を開裂することにより、また蛋白分解酵素である SP は主鎖蛋白の naked peptide を蛋白分解することにより、粘液の粘弾性を低下させるとされている<sup>8)</sup>。

Lieberman<sup>11,12)</sup> は *in vitro* で粘性喀痰と膿性喀痰を種々の粘液溶解剤で処理し、喀痰の粘性率を比較した。蛋白分解酵素は主に粘性喀痰に、EDTA は膿性喀痰に効果があり、urea は 3 M 以上では粘性、膿性喀痰の両方に効果を認めた。また、チオール製剤は粘性喀痰と膿性喀痰に著明な効果があったが、PG は効果がなかったとしている。また *in vitro* で最も有効である粘液溶解剤はチオール製剤の DTT と *N*-acetylcysteine で、DTT は acetylcystein より

低濃度 (1~100 mM) で強力な効果があるといわれている<sup>11,13)</sup>。本研究では DTT 処理群と SP 処理群が最も有効な粘液溶解を示した。

粘液溶解剤を用いて気道粘液を溶解、均一化し細胞診を行った報告としては、喀痰について pancreatin<sup>14)</sup>、trypsin<sup>15)</sup>、SP<sup>16)</sup> があり、中耳貯留液については DTT<sup>17)</sup>、polyethylene glycol<sup>4)</sup> があり、鼻アレルギー鼻汁について *N*-acetylcysteine<sup>18)</sup> などがある。Elierzer と Sadé<sup>17)</sup> は中耳貯留液の細胞診において、DTT (1~10 mM) が最も有効であったと報告している。本研究でも各処理時間における 10 mM DTT 処理群では、HBSS 処理群に比し細胞数の有意な差が認められず、他の薬剤処理群に比べ細胞数が有意に多かった。

各粘液溶解剤の細胞障害性については、pancreatin, trypsin, urea では強く<sup>15,16)</sup>、SP は 30~60 分処理ではほとんどなく<sup>16)</sup>、polyethylene glycol, DTT, *N*-acetylcystein では認められな

い<sup>17,18)</sup>とされている<sup>4,16,17)</sup>。本研究でも HBSS 処理群, DTT 処理群, PG 処理群では1~3時間の作用時間には細胞数に著明変化はなく, その他の薬剤処理群では比較的短時間に細胞の破壊などによる細胞数の減少をきたした。また SP 処理群では, 他群に比し1時間以後には細胞数が急速に低下していた。これは SP による蛋白成分の過消化の結果と考えられる<sup>15)</sup>。PG と urea は静菌作用があり, DTT は微生物叢を妨害しないといわれている<sup>8)</sup>。本研究では, SP 処理群でしばしば細菌の増殖が認められたが, 他群で細菌数に特別な変化は認められなかった。

Bascom ら<sup>18)</sup>は塗抹標本の染色性についてチオール製剤である acetylcysteine 処理鼻汁と処理前鼻汁との間に差がないことを示している。本研究でも DTT 処理群と HBSS 処理群との間には染色性の差は認められなかった。

すなわち, 10 mM DTT は他薬剤に比し有効な粘液溶解作用を得ることができ, 鼻汁中細胞数や細菌数に影響を示さなかったことより, 今回検討した薬剤の中では鼻汁の粘弾性を除き清明な定量的細胞診を行うのに適した粘液溶解剤と考えられる。

## まとめ

粘液の粘弾性を低下させる薬剤を用いて慢性副鼻腔炎粘膿性鼻汁の定量的細胞診を行い, 次の結果を得た。

1) 鼻汁中細胞数は DTT 処理群と Hanks 液処理群との間に有意差は認められなかったが, 他の薬剤処理群では Hanks 液処理群に比し有意に低下を示した。

2) 鼻汁中構成細胞の百分率は DTT 処理群と Hanks 液処理群との間に大部分の構成細胞において認めなかった。

3) DTT 処理群は Hanks 液処理群に比し粘液の影響が少なく, 良好な染色性と明瞭な視野を得ることが可能であった。

以上より, 鼻汁の定量的細胞診において粘弾性を除き, 細胞成分の正確な評価をするために

は 10 mM DTT に希釈・混和し, 4°C に1時間放置した場合が最も有効であることが結論された。

## 文 献

- 1) Eyer mann CH: Nasal manifestations of allergy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **36**: 808-815, 1927
- 2) Bryan MP, Bryan WTK: Cytologic diagnosis in allergic disorders. *Otolaryngol Clin North Am* **7**: 637-666, 1974
- 3) 板倉康夫ほか: 慢性副鼻腔炎鼻汁の研究; III. セラチオペプチダーゼの影響. *耳鼻臨床* **75**: 841-848, 1982
- 4) Wong J, Hawke M: The cytopathology of middle ear effusions (a new technique). *J Otolaryngol* **12**: 356-360, 1983
- 5) Whitmore EL, Hochberg F, Wolfson L *et al*: Quantitative cyto centrifugation in the evaluation of cerebrospinal fluid. *Acta Cytologica* **25**: 454, 1981
- 6) Chodosh S, Zaccheo CW, Segal MS: I. preliminary differential counts in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* **85**: 635-648, 1962
- 7) Lim DJ, Lewis DM, Schram JL *et al*: Otitis media with effusion; cytological and microbiological correlates. *Arch Otolaryngol* **105**: 404-412, 1979
- 8) Ziment I: Respiratory pharmacology and therapeutics. pp 41-104, WB Saunders Company, Philadelphia, 1978
- 9) 安岡 劭: 気道分泌の病態生理. *気管支学* **6**: 405-417, 1984
- 10) 間島雄一ほか: 慢性副鼻腔炎鼻汁の研究; VII. 鼻汁の粘弾性的性状に及ぼす L-システインエチル塩酸塩の影響. *耳鼻臨床* **81**: 909-915, 1988
- 11) Lieberman J: Measurement of sputum viscosity in a cone-plate viscometer; II. An evaluation of mucolytic agents *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* **97**: 662-672, 1968
- 12) Lieberman J: *In vitro* evaluation of the mucolytic action of urea. *JAMA* **202**: 694-696,

1967

- 13) Hirsch SR, Zastrow JE, Kory RC: Sputum liquefying agents; a comparative *in vitro* evaluation. *J Lab Clin Med* **74**: 346-353, 1969
- 14) Rawlins GA: Cytologic examination of sputum in relation to its macroscopic purulence. *J Clin Path* **8**: 114-116, 1955
- 15) Farber SM, Pharr SL, Wood DA *et al*: The mucolytic and digestive action of trypsin in the preparation of sputum for cytologic study. *Science* **117**: 687-690, 1953
- 16) 田村尚亮ほか: 喀痰溶解剤 serratio peptidase を用いた喀痰細胞分離法と分離細胞の分析. 気管支 **7**: 15-21, 1985
- 17) Elierzer N, Sadé J: Biochemical characterization of middle ear effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **81**: 394-400, 1972
- 18) Bascom R, Wachs M, Naclerio RM *et al*: Basophil influx occurs after nasal antigen challenge; effects of topical corticosteroid treatment. *J Allergy Clin Immunol* **81**: 580-589, 1988

### Quantitative Cytology of Nasal Secretions

Hwa Sik Lee, Yuichi Majima and Yasuo Sakakura

*Department of Otorhinolaryngology, Mie University School of Medicine*

The purpose of this study was to investigate a simple, practical technique for the liquefying of the sticky mucus elements within nasal secretions, and to identify and count of the cells contained quantitatively. The subjects used in this study were mucopurulent nasal mucus from patients with chronic sinusitis. The following agents in varying concentrations were added to the nasal mucus, and were compared for their mucus-liquefying effect determined by the count, the population and the staining characteristics of the cells in nasal secretions: dithiothreitol (DTT), ethylenediamine-tetraacetic acid tetrasodium salt (EDTA), propylene glycol (PG), serratio peptidase (SP), urea and Hanks' balanced salt solution (HBSS). HBSS was used as a control. For quantitative cytologic analysis smears were prepared from drug-treated nasal secretions with the use of a cytocentrifuge, and Wright-Giemsa stain was used on the obtained smears.

The results indicate that 10 mM DTT is most effective for quantitative cytologic study of mucopurulent nasal secretions.