

原 著

肺クリプトコッカス症に対する rapid on-site evaluation (ROSE) の有用性についての検討

岡山赤十字病院 呼吸器内科¹⁾, 病理診断科²⁾

梅野 貴裕¹⁾, 細川 忍¹⁾, 森田 絢子¹⁾, 中村 尚季¹⁾,
塩尻 正明¹⁾, 佐久川 亮¹⁾, 小倉 里奈²⁾, 林 栄子²⁾,
斎藤利江子²⁾, 増田 雅史²⁾, 林 敦志²⁾, 高橋 友香²⁾,
田村麻衣子²⁾, 別所 昭宏¹⁾

(令和元年 9月17日受稿)

要 旨

肺クリプトコッカス症は髄膜炎発症例では重症化の恐れもあり, 早期診断・治療が重要である. 本疾患における早期診断や診断精度の向上に対する気管支鏡検査時の rapid on-site evaluation (ROSE) の有用性について後方視的に検討を行った. 2015年4月から2019年6月の間に当院において, 気管支鏡検査時に ROSE を併用して診断した肺クリプトコッカス症の8例を対象とし, 臨床像や臨床経過とともに気管支鏡検査時の ROSE 結果と病理学的・真菌学的所見との比較を検討した. ROSE の所見は8例全ての症例で莢膜を有する菌体と多核巨細胞を確認できており, 組織診の所見と一致していた. 1例を除く7例で培養陽性であった. また, 基礎疾患を有する症例では気管支鏡検査後1~14日(中央値3日)で治療導入を行っていた. 本疾患において, ROSE の併用は診断精度の向上のみならず, 早期の診断や治療に対しても有用である可能性が示唆された.

Key words : Pulmonary cryptococcosis, Rapid on-site evaluation, Bronchoscopy, Endobronchial ultrasonography with a guide-sheath

緒 言

肺クリプトコッカス症は *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) による肺の真菌感染症で, 基礎疾患のない健常人に発症する原発性肺クリプトコッカス症と, 何らかの基礎疾患が背景にある immunocompromized host に発症する続発性肺クリプトコッカス症に分類される¹⁾. 肺の単独感染例の予後は一般的には良好とされているが, 髄膜炎発症例では重症化の恐れもあり, 早期の治療開始を必要とする感染症のひとつである. 確定診断は, 真菌学的, 病理学的なクリプトコッカスの証明による. 手段としてまず非侵襲的な気管支鏡検査でのアプローチを考えるが, その際には診断に十分な検体採取を行うことが重要となってくる. 肺癌診断のための検体採取においては ROSE を併用することにより, 診断精度の向上と患者への負担軽減につながる事が報告されているが²⁾,

本疾患における ROSE の併用の有用性についての報告は少ない³⁾. 今回, 我々は当院で経験した症例から本疾患の早期診断や診断精度の向上に対する気管支鏡検査時の ROSE の有用性について検討した.

対象と方法

2015年4月から2019年6月の間に当院において, ROSE を併用した気管支鏡検査で病理学的にクリプトコッカス菌体を証明し得た, または真菌学的にクリプトコッカスの発育を認めたことにより肺クリプトコッカス症の確定診断を得られた8例を対象とした. 臨床像として基礎疾患の有無, 症状, 胸部CT所見, 血清抗体価を, 病理学的に気管支鏡下での鉗子生検で採取した組織捺印検体や擦過検体の迅速細胞診と永久標本の所見を後方視的に比較検討した.

当院での気管支鏡検査は原則として, ガイドシ

ース併用気管支腔内超音波断層法 (endobronchial ultrasonography with a guide-sheath : EBUS-GS 法) を用いることにより X 線透視とともに病変部位の確認を行った。ROSE での染色方法は迅速性に優れた Diff-Quik 染色を使用し、気管支鏡検査中に擦過細胞診の検体や生検組織の捺印検体を用いて ROSE を行い、結果をすぐに術者に feedback し検体採取を繰り返している。永久標本での組織診では HE 染色以外に Papanicolaou 染色, Grocott 染色, PAS 染色により診断を行った。また、鉗子やブラシ洗浄液を用いた特殊染色のみならず、真菌学的検査のために洗浄液や時には採取した組織そのものを用いて培養を行った。

結 果

8 症例の概要を表 1 に示した。症例の内訳は男性 6 例、女性 2 例で、年齢は 39 歳から 85 歳であった。症状は 5 例で認め、咳嗽 4 例、背部痛 1 例であり、その他 3 例については胸部異常陰影のため精査となっていた。基礎疾患は 6 例にみられ、膠原病に対するステロイド・免疫抑制剤使用中である 3 例、糖尿病 2 例、サルコイドーシス 1 例であった。画像所見は 6 例が多発陰影を、単発腫瘤影 1 例、気管支内腫瘤 1 例であった。画像検査からは 3 例に肺癌が疑われていた。気管支鏡検査前に全例クリプトコッカス血清抗原が検査されており、7 例が陽性であった。

Diff-Quik 染色では、クリプトコッカスの莢膜は染色されないため、菌体が halo として描出されるが、生検組織の捺印検体や擦過検体を用いた迅速細胞診では 8 例全てで多核巨細胞と莢膜を有する菌体を確認できており、永久標本の組織診では全例クリプトコッカス菌体を認め、迅速細胞診と組織診の所見は一致していた。また、1 例を除く 7 例で *C. neoformans* が培養陽性であった。

ROSE でクリプトコッカスを疑う菌体を確認できた後、全例に腰椎穿刺が施行され、髄液検査で

の髄膜炎の合併について確認しているが、髄膜炎を認めた症例はなかった。

基礎疾患を有する 5 例における治療介入までの期間は 1 ~ 14 日 (中央値 3 日) であった。

ROSE の併用により、診断や治療に対して特に有用であった症例について提示する。

症例 1, 65 歳女性 (図 1)。関節リウマチに対して免疫抑制剤にて治療中であった。検診で右下葉に約 4 cm 大の腫瘤を指摘され紹介となり、肺癌を疑って気管支鏡検査を行った。EBUS-GS 下で病変部を確認しながら何度も生検部位を変更し生検を繰り返すも ROSE にて悪性所見はみられず、多核巨細胞様の細胞とその細胞室内に小円形物質を認めた。最終的に細胞診、組織診の結果クリプトコッカスの菌体と確認され、肺クリプトコッカス症の診断となり、F-FLCZ で治療を開始した。

症例 6, 47 歳男性 (図 2)。縦隔リンパ節のサルコイドーシスに対して経過観察中に咳嗽や労作時の息切れが出現し、CT にて両肺に多発する一部空洞形成を伴う結節影・浸潤影の出現を認めた。血清クリプトコッカス抗原が 64 倍と高値であり、肺クリプトコッカス症を疑って気管支鏡検査を行った。左 B8bi より EBUS-GS にて病変を確認し、検体採取を行うも ROSE ではマクロファージを認めるのみであり、クリプトコッカスを疑う菌体は確認できなかった。左 B8aii からのアプローチへ変更し、再度 EBUS-GS で病変を確認し、検体採取を行ったところクリプトコッカスを疑う菌体を確認できた。症状の増悪が急速であり、早急な治療介入が必要と考え、細胞診を至急で依頼したところ、翌日に細胞診でクリプトコッカス症の確定診断が得られたため、検査施行の翌々日に髄液検査を行った上で F-FLCZ にて治療を開始した。

考 察

肺クリプトコッカス症の原因菌として、*C. neoformans* と *C. gattii* が知られているが、*C. gattii* の発生地

表 1 肺クリプトコッカス症 8 例の臨床像

年齢	性別	基礎疾患	症状	画像所見	血清抗原価	Diff-Quik 染色 多核巨細胞/菌体貪食像	Grocotto 染色	培養	治療介入までの 期間 (日)	
1	65	女性	関節リウマチ	-	単発腫瘤影	32	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	6
2	39	男性	-	咳嗽	気管内腫瘤	4	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	35
3	78	男性	-	-	多発結節影	陰性	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	27
4	85	女性	関節リウマチ	背部痛	腫瘤影・結節影	128	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	14
5	79	男性	糖尿病	咳嗽	多発結節影	16	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	1
6	47	男性	サルコイドーシス	咳嗽	多発浸潤影	64	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	2
7	65	男性	-	咳嗽	多発浸潤影	32	+/+	+	<i>C. neoformans</i>	6
8	61	男性	糖尿病	-	多発結節影	32	+/+	+	陰性	3

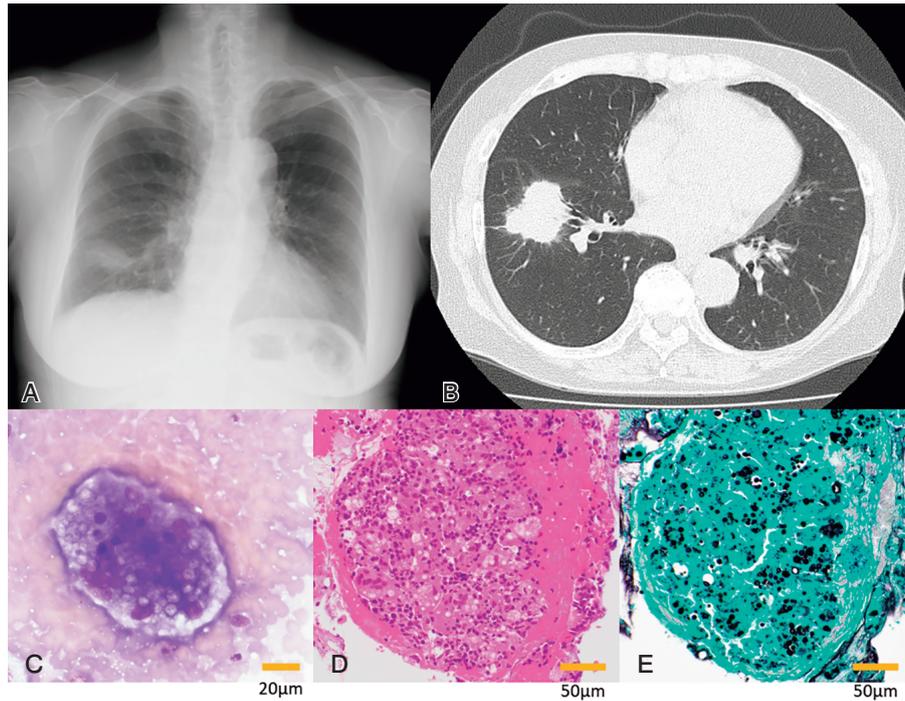


図1 症例1

A：胸部CR， B：胸部CT， C：Diff-Quik 染色（×40）， D：HE 染色（×20）， E：Grocott 染色（×20）

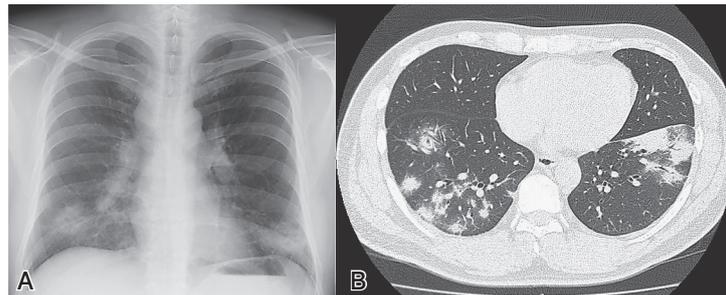


図2 症例6

A：胸部CR， B：胸部CT

域は熱帯や亜熱帯に限定されており，近年北米への拡大傾向が懸念されているが，本邦ではほとんどが *C. neoformans* の感染による。*C. neoformans* はハトやニワトリなど鳥類の腸管に定着生息しており，その糞便や糞便に汚染された土壌・汚水などを吸入することで経気道的に肺に至り感染する⁴⁾。

基礎疾患のない健常人に発症する原発性肺クリプトコッカス症と，何らかの基礎疾患が背景にある続発性肺クリプトコッカス症に分類される。緒方らは肺クリプトコッカス症116例中38例が続発性であり，基礎疾患としては血液疾患（10例），悪性疾患（8例），糖尿病（8例），膠原病（7例）が多く，肝疾患（4例），腎疾患（2例），呼吸器疾患（2例）であったと報告している¹⁾。また Dromer らの報告では HIV，HTLV-1 感染，移植後の免疫

抑制状態，長期のステロイド使用や糖尿病などが基礎疾患としてあげられている⁵⁾。

クリプトコッカスに対する免疫応答について，1型ヘルパーCD4陽性T（Th1）細胞が重要であり，Th1細胞の分化が誘導され，interferon- γ が産生されることでマクロファージが活性化され，誘導型一酸化窒素合成酵素などの抗真菌因子を多く発現することにより，クリプトコッカスの増殖を制御していると考えられている⁶⁾。そのためCD4陽性T細胞の減少を来す基礎疾患をもつ続発性クリプトコッカス症では真菌の増殖を抑制することができず，髄膜炎の合併など急速に進行し重篤化する症例も多く，死亡率は約10～20%と報告されている⁷⁾。よって特に続発性クリプトコッカス症においては，確定診断に必要かつ十分な検体採取

を行い、早急に治療を行うことが重要となってくる。

クリプトコッカス症の診断については、クリプトコッカス菌体が病理学的に証明された場合、または真菌学的には *C. neoformans* の培養陽性を確認できた場合に確定診断となる。確定診断が困難な症例においてはクリプトコッカス血清抗原陽性による臨床診断をもって治療へ進むこととなる。

病理学的診断としては、菌体の証明を必要とするが、Grocott 染色では真菌の細胞壁が黒色に染色されるため、形態の観察に適している。*C. neoformans* は直径 5～20 μ m で球状から長楕円形の酵母様真菌であり、莢膜多糖体の形成により種々の厚さの透明体が菌体を取り囲んでいる。多くの場合、この莢膜は PAS 反応で証明される。細胞性免疫が保たれている宿主では、基本的には肉芽腫性病変を形成し、細胞性免疫が低下している宿主では肺胞中に多糖を含む貯留物が見られ、内部に浮遊した状態で観察される⁸⁾。一般的に擦過細胞診では多核巨細胞を認め、内部には透明体を持つ菌体の貪食像が観察される。

クリプトコッカス血清抗原については、*C. neoformans* は生体内で増殖し、可溶性莢膜多糖類を多量に産生するため、血清学的診断法として抗原検出法であるラテックス凝集反応が感度、特異度ともに優れており、診断に有用とされている⁹⁾。非後天性免疫不全症候群の肺クリプトコッカス症の後方視的調査では、肺外病変を来した症例と比較し、肺病変のみであった症例では血清抗原陰性の割合が多かった¹⁰⁾。また、画像においては肺クリプトコッカス症の病変の大きさと血清抗原の関連について、16症例中、最大径が15mm以下の小結節影であった4症例は血清抗原が陰性であったと報告されており¹¹⁾、肺病変のみの小さな病変に関しては臨床的診断が難しいと考えられ、病変からの検体採取による病理学的診断の向上が重要と思われる。

肺クリプトコッカス症の画像所見は、原発性、続発性ともに単発結節影の症例が多いとの報告があり¹⁾、画像からは肺癌との鑑別が困難であることも多い。

迅速細胞診については、肺癌診断のための気管支鏡検査時に ROSE を併用することで有効検体が得られたことが確認でき、その有用性は認知されてきている¹²⁾¹³⁾。また、有効検体の確認以外に

も多くの情報を短時間で得ることができる可能性があると思われる。その中でも肺クリプトコッカス症においては多核巨細胞や莢膜を有する菌体の有無について検体採取後まもなくの確認が可能となり、必要最低限の生検で終了することで患者負担の軽減につながる。また経気管支肺生検での菌体証明率は70%程度であり、診断できなかった症例のほとんどは結節影であったとの報告もあるが¹⁾、病変への到達が困難な症例では ROSE を併用することで菌体が確認できない場合に他の気管支からのアプローチへ変更することで診断率の向上に役立つ可能性があると思われる。

当院の症例1では、当初は肺癌を疑い気管支鏡検査を行ったものの、ROSE にてクリプトコッカスを疑う菌体を確認できたことにより、培養検体の採取や追加染色を施行し、クリプトコッカス症の診断につながった。また、症例6では ROSE により検体の質や量についての情報を速やかに得られたことで、他陰影へ標的を変更し生検を繰り返すことで最終的に菌体を確認できた。ROSE を併用しなかった場合には病理学的なクリプトコッカス症の確定診断は得られなかった可能性もある。気管支鏡検査前の血清抗原価や画像所見などからクリプトコッカス症を疑う症例はもちろんのこと、単発陰影を示す臨床的には肺癌との鑑別が困難な症例についても ROSE を用い、クリプトコッカスを疑う菌体を確認できた場合には培養検査の追加などにより、診断率の向上につながる可能性があると考えられる。

この度の検討では肺クリプトコッカス症において、ROSE でクリプトコッカスの菌体が確認できた症例では全例とも永久標本で病理学的にもクリプトコッカス症の確定診断が得られており、抗原価高値や基礎疾患を有する高リスク症例では気管支鏡検査時に ROSE にて菌体の確認が得られた場合、直ちに髄膜炎の精査を行い、特殊染色での確認を至急行うことで早期治療開始による治療成績の改善にも寄与する可能性も考えられる。

結 論

肺クリプトコッカス症例の診断において、気管支鏡検査に ROSE を併用することにより、クリプトコッカス菌体を検査時に確認できるだけでなく、生検部位の妥当性や有効な検体量も同時に確認できるため、診断率の向上に役立つ可能性がある。

ると考えられた。また、ROSEにてクリプトコッカス症が疑われた場合には追加染色を早期に施行し、確定診断までの期間を短縮させることで早期の治療介入においても有用であると可能性が示唆された。

文 献

- 1) 緒方賢一, 綿屋 洋, 他: 肺クリプトコッカス症の2例—本邦報告116例からみた原発性と続発性の比較—。気管支学 **19**(2): 122—126, 1997.
- 2) 石濱洋美, 知元正行, 他: 気管支鏡による細胞組織診断—気管支鏡検査における迅速細胞診の有用性—。気管支学 **18**(8): 842—846, 1996.
- 3) Morichika D, Minami D, et al: A retrospective analysis of the background of patients with pulmonary cryptococcosis and diagnostic methods used. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**: A5445, 2015.
- 4) 渡辺一功, 磯沼 弘: 真菌症の臨床—内科領域真菌症—クリプトコッカス症。臨床と微生物 **15**(3): 318—323, 1988.
- 5) Dromer F, Mathoulin S, et al: Comparison of the efficacy of amphotericin B and fluconazole in the treatment of cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients: retrospective analysis of 83 cases. French Cryptococcosis Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **22** (Suppl2): S154—S160, 1996.
- 6) 石井恵子, 川上和義: クリプトコッカス感染における防御免疫機構の up to date. *Medical Mycology Journal* **55**(3): J107—J114, 2014.
- 7) 山上由理子: 各種真菌症の臨床的特徴と治療—クリプトコッカス症—。感染と抗菌薬 **7**(4): 395—399, 2004.
- 8) 若山 恵, 篠崎 稔, 他: 病理診断。 *Medical Mycology Journal* **54**(1): 27—37, 2013.
- 9) 篠田孝子: 深在性真菌症の血清学的診断法の評価に関する現状分析 II. クリプトコッカス症。日本医真菌学会雑誌 **36**(1): 70—74, 1995.
- 10) Baddley JW, Perfect JR, et al: Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**(10): 937—943, 2008.
- 11) 道津安正, 石松祐二, 他: 肺クリプトコッカス症16例の臨床的検討。感染症学雑誌 **79**(9): 656—663, 2005.
- 12) Bonifazi M, Sediari M, et al: The role of the pulmonologist in rapid on-site cytologic evaluation of transbronchial needle aspiration: a prospective study. *Chest* **145**(1): 60—65, 2014.
- 13) 金井一修, 赤松弘朗, 他: 気管支鏡検査における迅速細胞診 (ROSE) の精度管理に関する検討。気管支学 **38**(6): 490—493, 2016.

<Abstract>

The usefulness of rapid on-site evaluation (ROSE) for pulmonary cryptococcosis

Takahiro Umeno¹, Shinobu Hosokawa¹, Ayako Morita¹, Naoki Nakamura¹,
Masaaki Shiojiri¹, Makoto Sakugawa¹, Rina Ogura², Eiko Hayashi²,
Rieko Saito², Masafumi Masuda², Atsushi Hayashi², Yuka Takahashi²,
Maiko Tamura² and Akihiro Bessho¹

¹Department of Respiratory Medicine, ²Department of Pathological Diagnosis,
Japanese Red Cross Okayama Hospital

Pulmonary cryptococcosis that is complicated by cryptococcal meningitis can be a serious illness. Early diagnosis and treatment are of great importance. We retrospectively investigated the usefulness of ROSE on diagnostic bronchoscopy for pulmonary cryptococcosis concerning early diagnosis and improvement of diagnostic accuracy. From April 2015 to June 2019, 8 cases of pulmonary cryptococcosis were diagnosed by bronchoscopy while performing ROSE in our hospital. We compared and examined clinical features, clinical courses, results of ROSE, pathological and mycological results in those 8 cases. Round bodies

covered in a capsular, and multinucleated giant cells were detected in ROSE in all of 8 cases, and these findings are consistent with the pathological results. All cases except for 1 case, 7 cases, were positive in the culture. In the cases with some complications, the therapy was commenced within 1 to 14 days (median 3 days) after bronchoscopy. The combination use of ROSE on diagnostic bronchoscopy for pulmonary cryptococcosis can be probably useful for not only improvement of diagnostic accuracy but also early diagnosis and treatment.